

- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 1995: 516-692.
- [11] 王阶, 郭丽丽, 王永炎, 等. 方剂配伍理论研究方法及其研究前景[J]. 世界科学技术, 2008, 8(1): 1-4.
- [12] 苗晋鑫, 苗明三. 组方中药研究现状、存在问题及思考[J]. 中医学报, 2012, 9(27): 1116-1119.
- [13] 郑璐璐, 张贵君, 张春晖, 等. 黄金菊药效组分解热的生物效应[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 196-198.
- [14] 郑璐璐, 张贵君, 王晶娟, 等. 野菊花药效组分抗炎的生物效应研究[J]. 天津中医药, 2011, 28(3): 251-253.
- [15] 俞凌燕, 王毅, 范晓辉, 等. 用组方剔除法研究中药的有效组分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 336-338.
- [16] 刘亮亮, 隋峰, 闫美娟, 等. 大黄炮制品各组分泻下作用的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 161-165.

(编辑: 邓响潮)

杏香兔耳风总酚酸耐药突变选择窗的体外研究

刘 晓¹, 苏 丹^{1,2}, 谢 斌¹, 张武岗^{1,2}, 冯育林^{1,2}, 杨世林^{1,2} (1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 测定杏香兔耳风总酚酸和对照药绿原酸对金黄色葡萄球菌 ATCC26003 和大肠埃希菌 ATCC44102 的防耐药变异浓度(MPC)。方法 采用琼脂平板二倍稀释法, 测定杏香兔耳风总酚酸和绿原酸对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的最小抑菌浓度(MIC)、99%抑菌浓度(MIC₉₉)、初测 MPC(MPC_{pr})和 MPC。结果 杏香兔耳风总酚酸、绿原酸对金黄色葡萄球菌的 MIC、MPC 和细菌耐药选择指数 (MPC/MIC₉₉) 分别为 0.4, 6.0 mg·mL⁻¹; 10.8, 8.4 mg·mL⁻¹; 34.0, 1.6。对大肠埃希菌的 MIC、MPC 和 MPC/MIC₉₉ 分别为 12.0, 6.0 mg·mL⁻¹; 16.8, 9.6 mg·mL⁻¹; 1.4, 1.7。结论 杏香兔耳风总酚酸限制金黄色葡萄球菌耐药突变菌株作用强于绿原酸, 限制大肠埃希菌耐药突变菌株作用弱于绿原酸。

关键词: 杏香兔耳风总酚酸; 金黄色葡萄球菌; 大肠埃希菌; 防耐药变异浓度

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)05-0465-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.009

In-vitro Studies on Mutant Selection Window of Total Phenolic Acids from *Ainsliaea fragrans* Champ.

LIU Xiao¹, SU Dan^{1,2}, XIE Bin¹, ZHANG Wugang¹, FENG Yulin^{1,2}, YANG Shilin^{1,2} (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Mateia Medica, Nanchang 330006 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To measure the mutation preventing concentration(MPC) of total phenolic acids from *Ainsliaea fragrans* Champ. and control drug of chlorogenic acid for *Staphylococcus aureus* ATCC26003 and *Escherichia coli* ATCC44102. **Methods** The minimal inhibitory concentration (MIC), MIC for 99% of input cells (MIC₉₉), provisional MPC (MPC_{pr}) and MPC of total phenolic acids from *Ainsliaea fragrans* and chlorogenic acid for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were determined by agar plate doubling dilution method. **Results** The MIC, MPC and MPC/MIC₉₉ of total phenolic acids from *Ainsliaea fragrans* for *Staphylococcus aureus* strain ATCC26003 were 0.34 mg·mL⁻¹, 10.8 mg·mL⁻¹, 34.0, and those of chlorogenic acid were 6.0 mg·mL⁻¹, 8.4 mg·mL⁻¹, 1.6, respectively. The MIC, MPC and MPC/MIC₉₉ of total phenolic acids for *Escherichia coli* strain ATCC44102 were 12.0 mg·mL⁻¹, 16.8 mg·mL⁻¹, 1.43, and those of chlorogenic acid were 6.0 mg·mL⁻¹, 9.6 mg·mL⁻¹, 1.7, respectively.

收稿日期: 2013-06-06

作者简介: 刘晓, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药活性成分研究。Email: sunllxiao@outlook.com。通讯作者: 冯育林, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药活性成分研究。Email: fengyulin2003@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81102787); 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAI06A01-01); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-352); 江西省卫生厅中医药科研计划(2012A158); 江西省自然科学基金重点项目(2013ACB21005)。

Conclusion The effect of *Ainsliaea fragrans* total phenolic acids is stronger for restricting *Staphylococcus aureus* resistant mutants while is weaker for restricting *Escherichia coli* resistant mutants than that of chlorogenic acid.

Keywords: Total phenolic acids from *Ainsliaea fragrans*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; Mutant preventing concentration

杏香兔耳风(*Ainsliaea fragrans* Champ.), 又名金边兔耳、兔耳一支箭等, 全草入药, 性寒, 味苦, 归肺、肝经, 具有凉血止血、利湿解毒等功效, 主治虚劳骨蒸、妇女崩漏、湿热黄疸、瘰疬结核等症^[1], 化学成分主要有酚酸类、黄酮类、萜类等^[2]。近年来研究表明杏香兔耳风对盆腔炎、慢性宫颈炎等病症有显著治疗效果^[3], 现已有复方杏香兔耳风软胶囊等一系列抗宫颈炎的药物治疗。前期研究发现杏香兔耳风总酚酸是治疗宫颈炎的有效部位, 本实验进一步探讨杏香兔耳风总酚酸对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的体外抑菌和抑制耐药效果, 为该药材作为耐药抑制型药剂的开发应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 大肠埃希菌 ATCC44102 和金黄色葡萄球菌 ATCC26003, 均购自中国医学菌种保存中心。

1.2 药品及试剂 杏香兔耳风干燥药材, 购于江西婺源, 批号: 201001, 经江西中医药大学中药鉴定教研室刘庆华教授鉴定为菊科植物杏香兔耳风(*Ainsliaea fragrans* Champ.)的干燥全草; 杏香兔耳风总酚酸, 本实验室自制, 经高效液相色谱仪测定, 其中绿原酸(GCA), 3, 4-二咖啡酰基奎宁酸(3, 4-DCQA), 3, 5-二咖啡酰基奎宁酸(3, 5-DCQA), 4, 5-二咖啡酰基奎宁酸(4, 5-DCQA)含量之和大于 50%; 绿原酸对照品, 本实验室自制, 质量分数大于 98%; 二甲基亚砜(DMSO)、氯化钠, 分析纯, 西陇化工股份有限公司。

1.3 培养基 牛肉膏、琼脂粉和蛋白胨, 购于北京奥博星生物技术有限责任公司, 批号: 分别为2010513、20091102 和 20091112。

1.4 仪器 超净工作台及 CO₂ 恒温箱, 日本 SANYO 公司; 立式蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂。

1.5 方法

1.5.1 培养基制备 牛肉蛋白胨培养液: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 超纯水 1 L, 以 4 mol·mL⁻¹ 的氢氧化钠调 pH 7.0 ~ 7.2, 经 121 °C 灭菌 30 min, 冷藏备用。牛肉蛋白胨培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 15 ~ 20 g, 超纯水 1 L, 调

pH7.0 ~ 7.2, 经 121 °C 灭菌 30 min, 冷藏备用。

1.5.2 最小抑菌浓度(MIC)测定 采用琼脂二倍稀释法^[4]: 分别配制初始浓度为 24 mg·mL⁻¹ 的杏香兔耳风总酚酸和绿原酸药液, 二倍稀释 10 个浓度, 稀释倍数分别为 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256, 1 : 512。取单个菌落(cfu)放入 50 mL 牛肉蛋白胨培养液中, 37 °C 过夜培养, 先将菌液浓度调整为 0.5 麦氏单位(约 1.5 × 10⁸ cfu·mL⁻¹), 然后再将菌液浓度稀释到 1.5 × 10⁶ cfu·mL⁻¹。分别取 1.5 × 10⁶ cfu·mL⁻¹ 菌液 10 μL 接种于不同浓度的含药琼脂平板上, 每浓度重复 3 个平板, 37 °C 培养 18 h 后观察结果, 以平板上无菌生长的最低药物浓度定为 MIC。

1.5.3 99 % 抑菌浓度(MIC₉₉)测定 (1) 琼脂平板稀释法: 参照 Dong 等^[5]报道的方法, 以各药 MIC 为基准, 线性递减(10 %)抗菌药物浓度至 1/2MIC 配制含药的琼脂平板。(2) 过夜培养菌液比浊法: 将菌液浓度先调整为 3.0 × 10⁸ cfu·mL⁻¹, 再用肉汤 10 倍比稀释至 3.0 × 10³ cfu·mL⁻¹。用微量加样器在每个含药平板及无药平板分别接种不同浓度菌液各 10 μL, 37 °C 过夜培养, 选择合适菌液浓度的点进行菌落计数。以药物浓度为横坐标, 菌落恢复生长的比例为纵坐标绘制抗菌药物浓度 - 恢复生长菌落比例曲线, 计算 MIC₉₉。

1.5.4 防耐药变异浓度(MPC)测定 以各药 MIC 为基准, 采用琼脂二倍稀释法配置药物浓度从 MIC 到 64 mg·mL⁻¹ 的抗菌药物平板。细菌富集方法^[4,6]: 将单个菌落接种于 500 mL 牛肉蛋白胨培养液中, 20 r·min⁻¹ 37 °C 磁力搅拌器搅拌培养过夜, 菌液 3000 r·min⁻¹ 离心后, 弃上清, 再用无菌生理盐水将菌液浓度调整为 3.0 × 10¹⁰ cfu·mL⁻¹。分别取 3.0 × 10¹⁰ cfu·mL⁻¹ 菌液 100 μL 均匀涂抹在每个含有倍比稀释的抗菌药物牛肉蛋白胨琼脂平板上, 每个浓度 4 个平板, 每个药物浓度平板的细菌总接种量为 1.2 × 10¹⁰ cfu, 并通过菌落计数确保每个浓度平板的接种量为 10¹⁰ cfu。37 °C 培养, 以 72 h 时无菌落生长的最低药物浓度称为初测 MPC (provisional mutant Prevention concentration, MPC_{pr})。测定 MPC_{pr} 后, 再以 MPC_{pr} 为基准, 依次

递减(10%)抗菌药物浓度重新配制含药琼脂平板,重复 MPCpr 测定时的细菌富集及接种,以 72 h 时不出现菌落生长的最低药物浓度定为 MPC。对接近 MPC 的药物浓度筛选出的菌株再接种于无药平板上,传代 2 次后,再接种于原筛选浓度的抗菌药物平板上,确保所筛选出的菌株为耐药突变株。

1.5.5 菌落恢复生长比率曲线的描绘 用 MPC 方法富集细菌后,再将菌液从 3.0×10^{10} cfu·mL⁻¹ 倍比稀释至 3.0×10^3 cfu·mL⁻¹。根据 MIC₉₉ 测定及 MPC 测定时菌落生长情况,分别取不同浓度菌液 100 μL,接种于不同浓度的抗菌药物平板上,计数不同抗菌药物浓度平板上恢复生长的菌落数,计算菌落恢复生长比率,绘制突变菌株菌落恢复生长比率曲线^[9]。

1.6 数据处理 根据 MIC、MIC₉₉、MPCpr 和 MPC 结果,计算 MIC 范围、MPCpr 范围、MPC/MIC₉₉。

2 结果

2.1 对金黄色葡萄球菌标准菌的 MIC 和 MPC 测定 见表 1。杏香兔耳风总酚酸的 MIC 小于氯原酸,是绿原酸的 16 倍;杏香兔耳风总酚酸的 MPC 大于绿原酸;MPC/MIC₉₉ 差异较大,杏香兔耳风总酚酸是绿原酸的 21 倍。

表 1 杏香兔耳风总酚酸和绿原酸对金黄色葡萄球菌的作用 (mg·mL⁻¹)

Table 1 The results of *Ainsliaea fragrans* total phenolic acids and CGA against *S. aureus*

药物	MIC	MIC ₉₉	MPCpr	MPC	MPC/MIC ₉₉
杏香兔耳风总酚酸	0.4	0.3	12.0	10.8	34.0
绿原酸	6.0	5.3	12.0	8.4	1.6

2.2 杏香兔耳风总酚酸以及绿原酸对大肠埃希菌 MIC 和 MPC 的测定 见表 2。杏香兔耳风总酚酸的 MIC 大于绿原酸,抗菌作用较弱。杏香兔耳风总酚酸的 MPC 值大于绿原酸。MPC/MIC₉₉ 差异很小,杏香兔耳风总酚酸略小于绿原酸。

表 2 杏香兔耳风总酚酸和绿原酸对大肠埃希菌的作用 (mg·mL⁻¹)

Table 2 The results of *Ainsliaea fragrans* total phenolic acids and CGA against *E. coli*(mg·mL⁻¹)

药物	MIC	MIC ₉₉	MPCpr	MPC	MPC/MIC ₉₉
杏香兔耳风总酚酸	12.0	11.7	24.0	16.8	1.4
绿原酸	6.0	5.6	12.0	9.6	1.7

2.3 杏香兔耳风总酚酸和绿原酸菌落恢复生长比率曲线的绘制 见图 1~图 4。从图中可见随着药物浓度逐渐增加,恢复生长的菌落数出现两次明显下降。第

一次发生在 MIC 处随着药物浓度增加,绿原酸-金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌恢复生长曲线均出现一个平台区,而杏香兔耳风总酚酸-金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌恢复生长曲线则均经过一个拐点;然后药物浓度进一步增加,菌落出现第二次明显下降,直到到达 MPC 处,平板无菌落生长。

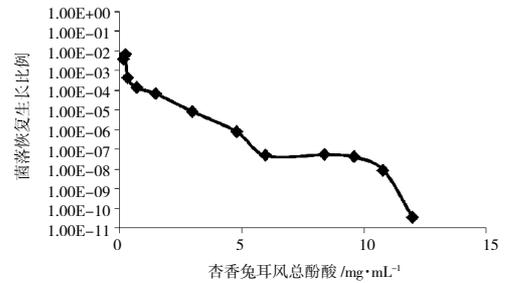


图 1 杏香兔耳风总酚酸-ATCC26003 菌落恢复生长曲线
Figure 1 The recovery rate curve of *Ainsliaea fragrans* total phenolic acids against *S. aureus*(ATCC26003)

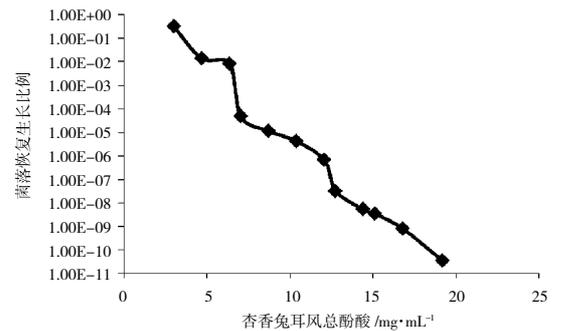


图 2 杏香兔耳风总酚酸-ATCC44102 菌落恢复生长曲线
Figure 2 The recovery rate curve of *Ainsliaea fragrans* total phenolic acids against *E. coli*(ATCC44102)

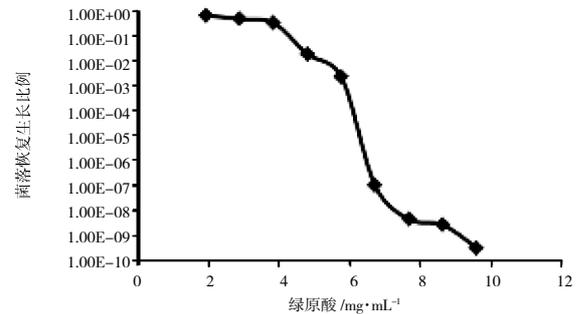


图 3 绿原酸-ATCC26003 菌落恢复生长曲线
Figure 3 The recovery rate curve of CGA against *S. aureus* (ATCC26003)

3 讨论

防耐药变异浓度(mutant prevention concentration, MPC),是指不会出现耐药菌落生长的抗菌药物浓度,也就是防止第一步或下一步耐药突变株被选择性富集

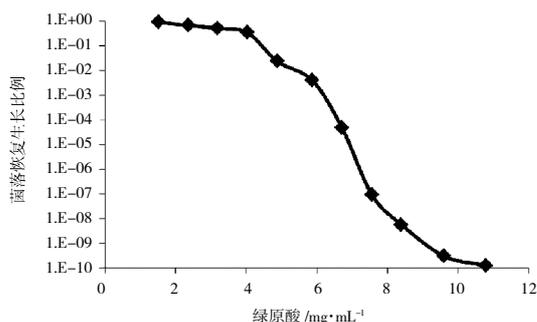


图4 绿原酸-ATCC44102 菌落恢复生长曲线

Figure 4 The recovery rate curve of CGA against *E. coli*(ATCC44102)

扩增所需的最低抗菌药物浓度^[2,5], 可作为评价抗菌药物抗菌活性及药物抑制耐药突变株选择能力的药效学参数。MPC 与 MIC 之比为选择指数(selection index, SI)用于比较抗菌药物选择耐药突变的能力, 数值越小, 药物抑制选择耐药突变能力越强。MIC 和MPC 之间的药物浓度范围^[7] 为耐药突变选择窗(mutant selection window, MSW), 该理论认为药物浓度在MSW 之间, 耐药突变菌株才会被选择性富集扩增, 从而产生耐药性。研究表明^[8,10], 通过 MIC 及 MPC 的测定, 目前所用的大部分抗菌药药物浓度均在 MSW 范围之内。这些研究为目前临床上广泛而严重的耐药问题提供了一个良好的研究依据, 开辟了防耐药研究的新领域, 具有重大的科学临床意义

本实验结果显示, 杏香兔耳风总酚酸对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的 MIC 分别为 $0.375 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 该药物对金黄色葡萄球菌的作用力很好。MPC 结果表明, 两者作用力差异缩小, 但是对金黄色葡萄球菌的作用较强。此结果表明该药抗革兰氏阳性菌作用较强。MPC/MIC₉₉ 表明, 杏香兔耳风总酚酸对金黄色葡萄球菌虽然 MIC 值较小, 但是 MSW 范围较宽, 细菌富集范围比较大。杏香兔耳风总酚酸对大肠埃希菌 MIC 值相对较大, 但是 MSW 范围较小, 说明细菌富集范围小。

本实验所制备的杏香兔耳风总酚酸有较高含量的绿原酸, 故把绿原酸设为对照药。绿原酸对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的 MIC 值同为 $6.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 表明抗菌作用力相似。MPC 结果表明绿原酸对金黄色葡

萄球菌作用略强。SI 值表明, 绿原酸对金黄色葡萄球菌的 MSW 稍微窄些。

综上, 对于金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌, 杏香兔耳风总酚酸和绿原酸均有抑制耐药菌作用, 且不易筛选出耐药突变株。在临床上, 通常将 MPC 理论与药代动力学参数相结合, 可以合理的选择给药方式和药物浓度, 在控制感染的同时防止耐药突变株的产生, 这也正是本课题须要继续探讨的方向。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 第7卷. 上海: 上海技术出版社, 1999: 641-642.
- [2] 邢春秀, 谢宁, 杨念云, 等. 杏香兔耳风的化学成分[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(2): 39-41.
- [3] 吴海英, 卢丽华, 陈坤. 保妇康栓联合复方杏香兔耳风胶囊治疗慢性宫颈炎疗效观察[J]. 中西医结合研究, 2011, 3(5): 248-249.
- [4] 豆梅琴, 孙成纯, 公衍文. 氟喹诺酮类药物对鲍氏不动杆菌耐药突变浓度测定[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(5): 849-850.
- [5] Dong Y, Zhao X, Domagala J, et al. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of mycobacterium bovis BCG and staphylococcus aureus [J]. Antimicrob Agents and Chemotherapy, 1999, 43: 1756-1758.
- [6] Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolones studies[J]. Clinical Infectious Diseases, 2001, 33(Supplement): 147-S156.
- [7] Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis update[J]. Clinical Infectious Diseases, 2007, 44(5): 681-688.
- [8] Sano C, Tatano Y, Shimizu T, et al. Comparative in vitro and in vivo antimicrobial activities of sitafloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin against mycobacterium avium[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(4): 296-301.
- [9] Cai Y, Yang J, Kan Q, et al. Mutant prevention concentration of colistin alone and in combination with levofloxacin or tobramycin against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(5): 477-478.
- [10] Liang B, Bai N, Cai Y, et al. Mutant prevention concentration based pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as dosing targets for suppressing the enrichment of levofloxacin-resistant subpopulations of Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(5): 2409-2412.

(编辑: 邓响潮)

欢迎订阅 《中药新药与临床药理》, 邮发代号: 46-210