

·论 著·

## 黄柏与五倍子抗菌活性物对肠球菌抑菌效果

彭文忠,王小燕,王美华

深圳市宝安区西乡人民医院检验科,广东 深圳 518102

**摘要:**目的 探讨高速逆流色谱(HSCCC)法提纯黄柏与五倍子配伍抗菌活性物质对粪肠球菌体外抑菌效果的影响。方法 选择150株临床分离野生粪肠球菌株,随机分为I组、II组与III组,每组各50株,均配制成2000cfu/ml~3000cfu/ml的菌液。黄柏与五倍子配伍药做成中药煎剂,配制成浓度成1g/ml为A药液,高速逆流色谱法提纯黄柏与五倍子配伍抗菌活性物质,配制成浓度成1g/ml为B药液;I组将粪肠球菌液涂到用A药液与M-H培养基混合的培养基上,II组将粪肠球菌液涂到用B药液与M-H培养基混合的药液培养基上,III组将粪肠球菌液涂到M-H培养基上,上述培养基均贴上环丙沙星(CIP)、红霉素(ERY)、四环素(TE)、青霉素(PEN)、氯林可霉素(CIE)、苯唑青霉素(OXA)和克拉霉素(CLA)药敏纸,并观察培养基药敏情况。结果 I组的CIP、ERY、TE、PEN、CIE、OXA和CLA耐药率分别为26%、40%、36%、30%、42%、38%和24%,II组III组为10%、26%、14%、8%、18%、24%、4%,和76%、92%、100%、88%、96%、90%、60%,对CIP、ERY、TE、PEN、CIE、OXA和CLA耐药率III>I组>II组,三组之间比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 高速逆流色谱法提纯黄柏与五倍子配伍抗菌活性物质对临床分离的粪肠球菌菌株具有较强的抑菌活性,其抑菌作用比黄柏与五倍子配伍药做成中药煎剂强。

**关键词:** 高速逆流色谱;药敏试验;黄柏;肠球菌;五倍子;中药

中图分类号:R378.99 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2014)1-32-03

Effect of antibacterial substance purified from combination of *Cortex Phellodendri* and *Galla Chinensis* by high-speed counter-current chromatography on *Enterococcus faecalis*

PENG Wen-zhong, WANG Xiao-yan, WANG Mei-hua.

Clinical Laboratory of Xixiang People's Hospital, Shenzhen 518102, Guangdong, P.R.China

**Abstract:** Objective To explore the influence of bacteriostasis on *Enterococcus faecalis* by antibacterial substance purified from combination of *Cortex Phellodendri* and *Galla Chinensis* by high-speed counter-current chromatography. **Methods** 150 strains of clinical wild *Enterococcus faecalis* isolates were selected and randomly divided into Group I, Group II and Group III, 50 strains in each group were made up as 2 000 cfu/mL~3 000 cfu/mL *Enterococcus faecalis* solution. The combination of *Cortex Phellodendri* and *Galla Chinensis* were formulated as solution A of 1 g/mL. Antibacterial substance purified by HSCCC was prepared as solution B with the concentration of 1g/mL. The *Enterococcus faecalis* solution was smeared on mixed culture medium of M-H medium and solution A in Group I, mixed cultured medium of M-H and solution B in Group II, and merely on M-H in Group III. The above-mentioned culture medium were all pasted with the drug sensitivity paper of ciprofloxacin(CIP), erythromycin (ERY), tetracycline(TE), penicillin(PEN), clindamycin (CIE) and oxacillin (OXA) and clarithromycin (CLA) so as to observe the drug sensitivity of the culture medium. **Results** The resistance rates of CIP, ERY, TE, PEN, CIE, OXA and CLA in Group I were 26%, 40%, 36%, 30%, 42%, 38% and 24%, respectively; and those in Group II were 10%, 26%, 14%, 8%, 18%, 24% and 4%, respectively and in Group III as 76%, 92%, 100%, 88%, 96%, 90% and 60%. The resistance rates of CIP, ERY, TE, PEN, CIE, OXA and CLA in Group III>Group I>Group II, and the statistically significant differences of drug resistance rates among the three groups were found( $P<0.05$ ). **Conclusions** The antibacterial substance purified from the combination of *Cortex Phellodendri* and *Galla Chinensis* purified by HSCCC has a strong antibacterial activity on clinical *Enterococcus faecalis* isolates, and its antibacterial action is stronger than the decoction of combination golden cypress and Chinese Gall.

**Key words:** High-speed countercurrent chromatography; Drug susceptibility test; *Cortex Phellodendri*; *Enterococcus faecalis*; *Galla Chinensis*; Traditional Chinese medicine

肠球菌为革兰阳性兼性厌氧菌,肠球菌是仅次于葡萄球菌的第2位重要院内感染病原菌,肠球菌绝大多数病原体是粪肠球菌,占80%<sup>[1]</sup>。近年来,肠球菌多重耐药严重,我们采用高速逆流色谱(HSCCC)法提纯

黄柏与五倍子配伍抗菌活性物质对粪肠球菌的药物敏感性,旨在研究提纯黄柏与五倍子配伍抗菌活性物质对粪肠球菌抗耐药效果。

## 1 材料与方法

基金项目:深圳市宝安区科技局立项课题(No.2013228)

作者简介:彭文忠(1973~),男,本科,主管技师,研究方向:临床检验。

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 从2010年5月~2013年8月期间我住院患者送检的各类临床标本,分离到的150株粪肠球菌,按照随机原则分为I、II与III三组各50株,所有粪肠球菌菌株均剔除同一患者重复分离菌株,各类标本均按照《全国临床检验操作规程》第2版要求采集后立即送检,肠球菌的分离与鉴定采用美国Microscan公司的AutoSCAN-4肠球菌鉴定条鉴定药敏试验,质控菌株金黄色葡萄球菌ATCC25923和粪肠球菌ATCC51299均来自卫生部临检中心,所有操作均严格参照产品说明书进行。

1.1.2 药敏纸片 青霉素(PEN)10μg/片、红霉素(ERY)15μg/片、环丙沙星(CIP)5μg/片和四环素(TE)30μg/片,氯林可霉素(CLE)30μg/片,苯唑青霉素(OXA)5μg/片,克拉霉素(CLA)15μg/片,均购自英国OXOID公司。

### 1.2 方法

1.2.1 中药液制备 黄柏与五倍子均购自北京景琪饮片厂,黄柏批号:20100417,五倍子批号:20100321;黄柏与五倍子配伍做成中药煎剂,配制成浓度成1g/mL为A药液;HSCCC提纯黄柏与五倍子配伍抗菌活性物质,高速逆流色谱法溶剂系统为乙酸乙酯-石油

醚-甲醇-水,体积比为1:1:1:1提取黄柏与五倍子配伍抗菌活性物质,配制成浓度成1g/mL为B药液;

1.2.2 药敏试验 I组将粪肠球菌液涂到用A药液与M-H培养基混合的药液培养基上,II组将粪肠球菌液涂到用B药液与M-H培养基混合的药液培养基上,II组将粪肠球菌液涂到M-H培养基上,上述培养基均贴上环丙沙星(CIP)、红霉素(ERY)、四环素(TE)、青霉素(PEN)、氯林可霉素(CLE)、苯唑青霉素(OXA)和克拉霉素(CLA)药敏纸,观察培养基上CIP、ERY、TE、PEN、CLE、OXA和CLA耐药率。

1.3 统计学分析 所有数据资料应用SPSS13 for Windows统计软件进行分析,计数资料使用 $\chi^2$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

三组对CIP、ERY、TE、PEN、CLE、OXA和CLA耐药率,III组>I组>II组,三组之间的CIP、ERY、TE、PEN、CLE、OXA和CLA耐药率比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),显示II组对CIP、ERY、TE、PEN、CLE、OXA和CLA耐药率最低,I组为次,对照III组最高,以高速逆流色谱法提纯黄柏与五倍子配伍抗菌活性物质对粪肠球菌体外抑菌效果比中药煎剂好,见表1。

表1 三组粪肠球菌耐药率比较情况

Table 1 Comparison of resistant to *Enterococcus faecalis*

组别 Groups	菌株(n) Strain	耐药率[n(%)] Resistance rate						
		CIP	ERY	TE	PEN	CLE	OXA	CLA
I组	50	13(26)	20(40)	18(36)	15(30)	21(42)	19(38)	12(24)
II组	50	5(10)**	13(26)**	7(14)**	4(8)**	9(18)**	12(24)**	2(4)**
III组	50	38(76)*	46(92)*	50(100)*	44(88)*	48(96)*	45(90)*	30(60)*

注:与I组比较,\* $P<0.05$ ;与III组比较,\*\* $P<0.05$  Note: Compared with Groups\* $P<0.05$ ; Compared with Group III.

## 3 讨论

肠球菌(*Enterococcus*)属肠球菌属,肠球菌普遍存在于自然界,为革兰阳性( $G^+$ )球菌,一般栖居在健康人体上呼吸道、口腔或肠道,是种条件致病菌,感染的范围比较更加广泛,主要引起腹腔感染、盆腔感染、尿路感染、皮肤软组织感染以及败血症、心内膜炎、外伤性组织感染和化脓性腹部感染等,甚至起危及生命<sup>[3]</sup>。由于广谱抗生素的大量滥用和粪肠球菌的固有耐药和获得性耐药性质,使粪肠球菌对大多数常用的抗生素呈相对的或绝对的耐药,使许多常用抗菌药物在治疗粪肠球菌感染时失败,这给临床治疗带来非常大的困难,常引起院内感染的暴发流行,从临床培养分离出来的粪肠球菌,都应该经过抗菌药物敏感试验来选择抗生素及其剂量才是治疗的最佳的途径<sup>[4]</sup>;有研究报道<sup>[5]</sup>,耐万古霉素的肠球菌对青霉素G、氨苄西林

及呋喃妥因等常用抗菌药物的耐药性呈增强趋势。

HSCCC是20世纪80年代发展起来,由美国Ito博士研发的一种新型的液-液分配色谱技术,主要是利用螺旋管分离柱在做行星式运动时形成的单向性流体动力平衡体系,使得互不溶解的两相溶液不断充分混合,同时保留其中的一相作为色谱分离的固定相,而另一相在恒流泵的作用下连续输入作为色谱分离的流动相,从而在螺旋管柱内形成固定相与流动相连续的两相分割分离与对流趋向,实现连续、高效的液-液分配物理过程,近年来,国内外对HSCCC的应用也越来越广,如用于天然药用植物活性成分分离及标准品制备、快速分离和重要指纹图谱分析、天然新药的研发和筛选,其优点是固定相和流动相均为液体,所以不会产生固体载体所造成的吸附耗损等问题。可见,所以HSCCC越来越广泛地应用于中药有