

龙甘胃舒浸膏抗幽门螺杆菌的体外抑菌实验

★ 虞金宝 聂荣庆 吴东风 李晶 (江西省中医药研究院、江西省中药质量标准工程技术研究中心 南昌 330077)

摘要:目的:观察中药龙甘胃舒浸膏对幽门螺杆菌的体外抑菌作用。方法:采用液体稀释法,把龙甘胃舒浸膏与幽门螺杆菌共同培养,通过比较细菌生长情况而确定龙甘胃舒浸膏最小抑菌浓度(MIC);采用非致死量含药和无药培养基上连续传代培养的幽门螺杆菌为实验菌,油镜观察细菌形态,同时测定尿素酶和触酶活性,以及 MIC 值。结果:龙甘胃舒浸膏对幽门螺杆菌有抑菌作用,非致死量含药和无药组比较,中药不会改变细菌形态,不会使尿素酶和触酶活性丧失,与中药接触一段时间的细菌,对该药仍敏感。结论:浓度为 12.5 mg/ml 龙甘胃舒浸膏可有效抑制幽门螺杆菌的生长,且不产生耐药性。

关键词:幽门螺杆菌;龙甘胃舒浸膏;药敏

中图分类号:R 285 **文献标识码:**A

幽门螺杆菌(Hp)在人的胃内定植,与慢性胃炎、消化性溃疡、胃 MALT 淋巴瘤和胃癌密切相关^[1]。随着抗 Hp 治疗的广泛开展,Hp 对抗生素的耐药日益严重,导致根除 Hp 的难度逐渐增大。根据临床指征,对 Hp 进行根除治疗是目前医学界的共识,合理的选择药物对取得理想的根除至关重要,因此寻找高效、低毒、廉价的抗 Hp 药物,特别是挖掘祖国医学宝库开发新型抗 Hp 药物的研究引人注目。

本文采用微量液体稀释法,测定中药龙甘胃舒浸膏对幽门螺杆菌的最小抑菌浓度(MIC),观察龙甘胃舒浸膏对幽门螺杆菌的体外抑制作用及耐药性,探讨龙甘胃舒浸膏在幽门螺杆菌防治中的应用前景。

1 材料和方法

1.1 实验菌液的准备 幽门螺杆菌实验菌株采用标准菌株 NCTC 11637(上海医科大学华山医院提供)。细菌菌种接种于含 5% 小牛血清的 BHI 琼脂培养基(Biomexieux 公司)平皿,置 15% CO₂、85% N₂ 培养体系的 37℃ 厌氧培养箱(浙江义乌 DY-2 型厌氧培养箱)中,复苏培养 72 h,再传代厌氧培养 72 h,G 染色及尿素酶、触酶试验鉴定后,分别挑取多个典型菌落混悬于 BHI 液体培养基中,调整菌液浓度为 5×10^6 CFU/ml。

1.2 龙甘胃舒浸膏不同浓度的配制 龙甘胃舒浸膏(每 1 g 浸膏含生药 3 g)(自制)。称浸膏 1 g 加水至 7.5 ml,生药浓度为 400 mg/ml,微孔滤膜过滤除菌备用。用无菌的含 5% 小牛血清的 BHI 液体培养基对中药龙甘胃舒浸膏进行稀释,调整龙甘胃舒浸膏浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、0 mg·ml⁻¹。

1.3 龙甘胃舒浸膏与实验菌液的混合及厌氧培养 各浓度组龙甘胃舒浸膏及实验菌液均取 100 μl 于无菌的 96 孔细胞培养板中混合,每组 3 孔,另设不含药物(0 mg/ml)的培养液作为阳性对照,不含药物和细菌的培养液作为阴性对照。克拉霉素作为阳性药物对照。将加好样的 96 孔细胞培养板置

15% CO₂、85% N₂ 培养体系的 37℃ 厌氧培养箱中培养 72 h。此时龙甘胃舒浸膏终浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625 mg·ml⁻¹。幽门螺杆菌终浓度为 2.5×10^6 CFU/ml。

1.4 MIC 测定 取出厌氧培养 72 h 的 96 孔细胞培养板,观察细菌生长情况。阳性对照孔(0 mg/ml)有细菌生长,培养物呈混浊状,阴性对照孔无细菌生长,培养物清亮,确定无细菌生长(培养物清亮)的最低浸膏浓度,此浓度即为龙甘胃舒浸膏 MIC。

1.5 最低杀菌浓度(MBC)测定 厌氧培养 72 h 的 96 孔细胞培养板,无细菌生长(清亮的)培养孔均取一环培养物于含 5% 小牛血清的 BHI 琼脂培养基平板涂布画线,阴性、阳性对照孔也均取一环培养物,于含 5% 小牛血清的 BHI 琼脂培养基平板涂布画线,置 15% CO₂、85% N₂ 培养体系的 37℃ 厌氧培养箱中培养 72 h,观察有无细菌生长。无细菌生长的最低浸膏浓度,即为龙甘胃舒浸膏 MBC。阴性对照孔无细菌生长,阳性对照孔有细菌生长。

1.6 幽门螺杆菌在非致死量含药和无药的 5% 小牛血清 BHI 琼脂培养基中传代培养 将幽门螺杆菌接种于含 2 mg/ml 生药和无药的 5% 小牛血清的 BHI 琼脂培养基的平皿上,置 15% CO₂、85% N₂ 培养体系的 37℃ 厌氧培养箱中培养 72 h 进行传代培养。连续传代培养三代,细菌涂片革兰染色油镜观察细菌形态,同时测定尿素酶和触酶活性,以及 MIC 值。

1.7 尿素酶的测定方法 挑取一环固体培养基上的细菌菌落仅涂布于尿素琼脂培养基半斜面的斜面上,经 37℃ 培养 6 h 观察结果,呈红色则证明尿素已被分解,红色为阳性,黄色为阴性。

1.8 触酶试验 挑取一环固体培养基上的细菌菌落放于洁净玻片上,滴加 3% 过氧化氢数滴,30 s 内有大量气泡产生者为“阳性”;无气泡产生者为“阴性”。

2 结果