五十种广西常用壮药抗幽门螺杆菌感染的筛选研究*

★ 张煜** 王彦峰 王江涛 （广西中医学院 南宁 530001）

摘要：目的：从五十种广西常用壮药中筛选出有抗幽门螺杆菌（H. pylori）作用的药物。方法：采用打孔琼脂扩散法，测量供试药物抑菌圈的直径，每味药重复3次，对五十种广西常用壮药进行抗H. pylori作用的筛选研究。结果：抑菌圈直径大于20 mm的药物有：苦丁茶、金果榄、小飞扬草、黄藤、槟榔；抑菌圈直径在15 mm～20 mm的药物有：一枝箭、钻地风；抑菌圈直径在10 mm～15 mm的药物有：救必应、杠板归、五指枫、金盏银盘、番木瓜、九节茶、石仙桃、大力王；其余35味药物的抑菌圈直径均小于10 mm。结论：50味广西常用壮药、中草药以苦丁茶、金果榄等15味在体外可抑制HP的生长，而其中4味抑菌作用明显，其中11具有中度抑菌作用，其余药物抑菌作用低或无。

关键词：壮药；中草药；幽门螺杆菌；抑菌
中图分类号：R 287.705 **文献标识码**：A

Study on anti-H. pylori drug among fifty kind of Zhuang Yao

ZHANG Yu, WANG Yan-feng, WANG Jiang-tao
Guangxi college of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001

Abstract: Objective: To find out anti- H. pylori drug among fifty kind of Zhuang Yao. Method: the diameter of bacteriostasis circle was measured by using agar well diffusion method, ach drug three times. Result: the diameter of bacteriostasis circle exceed 20 mm as follows: roadleaf lly leaf, tinoporae, thymifolious euphorbia herb, huangteng, betel nut; the diameter of bacteriostasis circle between 20 mm and 15 mm as follows:. Yizhijian, Chinese hydrangeavine root-bark; the diameter of bacteriostasis circle between 15 mm and 10 mm as follows: holly bark, smartweed Herba, wuzhifeng, railway beggarticks herb, papaw, glabrous sarcandra herb, Chinese pholidota pseudobulb, daliwang; the others were below 10 mm. Conclusion: among the fifty Zhuangyao broadleaf holly leaf, tinoporae and other 15 medcine can inhibit the H. pylori, four kind fungistasis obviously, eleven midrange fungistasis

Key words: Zhuangyao; Chinese herbal medicine; Helicobacter pylori; bacteriostasis

●实验研究●

幽门螺旋杆菌（Helicobacter pylori，H. pylori）是定植于人体胃黏膜表面与粘膜层之间的微需氧菌，它是胃炎、消化性溃疡的主要致病因素[1]，与胃MALT淋巴瘤关系较为明确，几乎所有患者胃粘膜中均可发现H. pylori[2]，并且与胃癌的发生密切相关[3]。我国是H. pylori感染率较高的国家，无症状人群中H. pylori感染率达50.5%－65.4%[4,5]，因此如何预防H. pylori感染，特别是大规模人群防治是当今医学界急待解决的问题。目前对H. pylori的治疗水平经历了从单一抗菌药治疗、两种药物联合治疗到三、四联治疗的发展过程。其临床疗效值得肯定，但又存在着许多的临床问题。如药物过敏反应，加重消化不良症状，对血液系统、肝肾功能的影响以及细菌耐药等毒副作用，为此急待寻找高效、低毒、价廉的抗H. pylori天然药物。本实验选择了50味广西常用壮药进行抗H. pylori体外抑菌的筛选研究，现将实验结果报告如下：

1 材料

1.1 主要设备及仪器

超净工作台（苏州净化设备厂），隔水式电热恒温培养箱（上海医疗器械七厂），752型紫外分光光度仪（上海第三分析仪器厂），－70℃超低温冰箱（日本三洋公司生产），手提式不锈钢蒸汽消毒器（上海三申医疗器械有限公司）。

1.2 主要生化试剂及条件：

布氏肉汤和血琼脂基础，均购自杭州天和微生

* 基金项目：广西科技厅基金资助项目（桂科青0832051）
** 作者简介：张煜（1971—），男，山东淄博人，广西中医学院副教授，医学博士，硕士研究生导师。研究方向：脾胃病研究。

物试剂有限公司(批号:080612、080509);选择性抗生素添加剂(盐酸万古霉素 250 mg,TMP150 mg,多粘霉素 B 250 IU,两性霉素 B 250 mg),购自北京陆桥技术有限责任公司;哥伦比亚固体培养平板,购于杭州天和微生物试剂有限公司(批号:080722);脱纤维绵羊血(广西中医学院瑞康医院检验科赠);小牛血清,购自南宁市生化药品仪器有限公司;混合气体(N285%,CO210%,O25%)由南宁气体供销有限公司提供;革兰染色剂,购自南宁市生化药品仪器有限公司;尿素酶试纸(珠海珠信公司生产)

1.3 菌株来源

全部试验菌株系从广西中医学院附属瑞康医院胃病患者临床胃镜下所取胃粘膜组织所得,同时将标本无菌剪碎,30min 内接种于 H. pylori 琼脂培养基上,于5% O_2,10% CO_2,85% N2,湿润环境中 37 ℃培养 3~4d,选择紫色带有闪光的可疑菌落作革兰染色,镜检为 G-,细长弯曲海鸥状细菌,做快速脲酶试验 4h 内阳性,氧化酶,过氧化氢酶均阳性者,确定为 H. pylori,供试验用。

1.4 五十种壮药,购自南宁国医药店。

2 方法

2.1 提取物制备 取药材古羊藤、半边莲、救必应、苦丁茶、金果榄、毛果算盘子、杠板归、穿心莲、金线风、水田七、毛冬青、绞股兰、金盏银盘、黄藤、望江南子、象皮木、小飞扬草、铁苋菜、凤尾草、一枝箭、三姐妹、五指枫、荞麦、青蒿等,九龙藤、两面针、小毛蒌、三加皮、龙血竭、九里香、番木瓜、钻地风、金盏菊、凌霄、徐长卿、九节茶、大力王、寻骨风、八角、山苍子、大良姜、山柰,驱虫杀虫的有黄皮果、芦荟、槟榔、椿白皮、大风艾、透骨消等,利湿散瘀的有石仙桃、矮地茶等各味药 50g 加适量水,文火煎煮 2 h,过滤,滤渣加适量水,文火煎煮 30 min,过滤,合并两次滤液,浓缩至每 1 ml 含原药 1 g 的药液,并调 pH 值为 7.4,装瓶密封,经高压灭菌或间歇灭菌后,存冰箱备用。另外取文献报道的具有抗 H. pylori 作用的黄连、黄芩、黄柏、鱼腥草、蒲公英、紫花地丁、丹参等各味药 50 g。按照同样的煎煮方法煎煮并灭菌后,存冰箱备用。

2.2 布氏肉汤血琼脂培养基的配制(1L) 称取布氏肉汤粉末 28 g,血琼脂基础 41 g 溶解于 1000 ml 蒸馏,调 pH 至 7.4。高压灭菌 15 min,冷却至 55 ℃左右时,于超净工作台无菌环境下加入脱纤维绵羊血 80 ml,及幽门螺杆菌选择性添加剂盐酸万古霉素 250 mg、TMP150 mg、多粘霉素 B 250 IU,两性霉素 B 250 mg,配制成添加剂溶液,摇匀后倒平板,冷却凝固 4 ℃冷藏保存备用。

2.3 保藏菌株的活化 取 0.1 ml 冻融的 H. pylori 保存菌株置于布氏肉汤血琼脂培养基平板上,涂布均匀,于 37℃ 微需氧环境($N_2$85%,$CO_2$10%,$O_2$5%)下培养 72 h。

2.4 菌悬液的制备 取一环活化的 H. pylori 于 10 ml 液体培养基中,培养 12~18 h,用接种环挑取针尖大小的菌落,将其重悬于含 0.4 ml 无菌生理盐水的 Eppendorf 管中,混匀,600 nm 波长下测定其吸光度(OD)以判定含菌量,生理盐水为空白对照调 0 后,测得其 OD 值为 1.038,按照 1 个 OD 值等于 108 含菌量来计算得出其细菌含量为 1.038×10^8。根据紫外分光光度仪的 OD_{625} 值将菌悬液浓度校正为 1×10^8 CFU/ml。

2.5 检测方法 抑菌圈的测定。

采用打孔琼脂扩散法:取直径 9 cm,培养基厚度约 4 mm 的选择性布氏肉汤血琼脂培养基平板,每块平板加入 100 μl 配置好菌悬液,立即用涂布棒涂布均匀。之后,每个培养皿挖 4 个杯状小孔,呈均匀分布,每孔直径 5 mm。往每孔中加入 15 μl 不同品种的中药液,37 ℃微需氧(5% O_2、10% CO_2 85% N_2)、相对湿度 >98% 的条件下培养 72 h,观察抑菌圈,测量直径。每味中药重复 3 次。

3 结果

表 1 15 味供试药物及部分对比药物对 Hp 的抑菌直径 mm

药物	第一次	第二次	第三次	平均值
苦丁茶	19	21	26	22
金果榄	15	24	25	21
小飞扬草	18	24	18	20
槟榔	21	22	22	22
黄藤	32	23	24	26
一枝箭	16	17	19	17
钻地风	20	18	19	19
救必应	10	13	14	12
杠板归	10	11	11	11
五指枫	7	12	11	10
金盏银盘	11	12	12	12
番木瓜	8	14	14	12
石仙桃	9	11	12	10
九节茶	7	14	14	11
大力王	10	11	11	11
黄连	26	28	40	33
黄芩	23	30	34	29
黄柏	20	23	25	23
鱼腥草	19	18	16	17
丹参	15	13	17	15
紫花地丁	14	17	16	16
蒲公英	11	13	13	12

50 味药中,以苦丁茶、金果榄、小飞扬草、黄藤、槟榔 5 味药物抑菌作用明显,一枝箭、钻地风 2 味药

从脉象特征的系统表述谈脉诊教学的改革设想

★ 黄利兴 刘英锋 （江西中医学院中医研究所 南昌 330006）

摘要:本文从中医诊断学教材脉诊存在的问题入手,探讨了脉诊改革的必要。提出了建立脉象特征体系、规范脉象表述方法;归类表述28脉,比对彼此特征差异;深入探究特征意义,指导病脉主病意义的改革设想。

关键词:脉诊;中医诊断学;教材;改革
中图分类号:R　　**文献标识码**:A

Discussion on the Reform Assumption of Pulse Diagnosis Instruction by the Systematic Expression of Pulse conditon Feature

HUANG Li-xing,**LIU Ying-feng**
Istitute of Traditional Chinese Medicine,*Jiangxi University of Traditional Chinese Medition*,*Nanchang* 330006

Abstract:The Article discusses on the necessary of pulse diagnosis revolution from existing problem of Traditonal Chinese diagonostics textbook. Put forward the reform assumption of buliding pulse condition feature systems and standarding the expression pattern of pulse condition,classifying 28 pulse and comparing their difference of each other,investigating their feature significance and guiding abnormal pulses revealing some disease.

Key words:Pulse Diagnosis;Traditional Chinese Diagonostics;Textbook;Reform

物呈中度抑菌作用,救必应、杠板归、五指枫、金盏银盘、番木瓜、九节茶、石仙桃、大力王8味药物呈轻度抑菌作用。其余35味药物抑菌作用偏低或无。

4 讨论

（1）Hp的培养:Hp的培养要求较高,对营养、温度、湿度、气体条件均要求较苛刻。本研究初次摸索培养方法,所以初次实验分离培养的阳性率不高。Hp为微需氧细菌,培养的气体要求一般为5% 0_2、10% CO_2 和85% N_2,曾尝试使用过文献报道较为便捷的 CO_2 培养箱进行培养,但因气体条件很难控制培养效果很不理想。后又曾想试用采用微需氧发生袋,通过产气包在密闭的小环境中达到微需氧状态,效果可以但成本相对较高。但本实验为大规模的药物筛选研究,从实验条件和经济状况来说该方法也是不实用的。最后试用烛缸法,即把接种好的培养皿放入磨口玻璃钢缸中,然后放进一支点燃的蜡烛,密封。待蜡烛自然熄灭后,缸中气体分布接近5% 0_2、10% CO_2 和85% N_2。

（2）展望:虽然体外抑菌浓度不及甲硝哇等常用抗生素,中药材的低毒副作用,低耐药性的突出优点使其仍具有广泛深入研究的价值。筛选出有抗菌作用的中药,采用合理的技术提取纯化有效成分,将先进的药物化学技术应用到中药材开发领域,扬长避短,开发出药效明确、服用简单、低毒副作用、低药物抵抗的中药制剂,将为今后解决治疗Hp感染的难题开辟广阔的前景。

参考文献

[1] Guisset M,Coton T,Rey P,et al. Helicobacter pylori infection in developing countries. Med Trop (Mars). 1997;57(1):77－82.
[2] Parsonnet J,Hansen S,Rodriguez L,et al. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. N Engl J Med. 1994 May;330(18):1267－1271.
[3] 张万岱,吴炎,杨海涛,等. 胃癌自然人群幽门螺杆菌感染的血清流行病学调查[J]. 中华消化杂志,1995,15:276－278.
[4] 邓小英,林三仁. 北京国际溃疡病会议纪要[J]. 中华内科杂志,1996,35:212－213.
[5] 中华医学会消化病学分会. 对幽门螺杆菌若干问题的共识意见(2006. 中国). 中华医学杂志,2006,84(6):522.

（收稿日期:2009-06-11）