

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.10.007

英花伤宁口服液抗炎抗菌作用研究*

张洪涛¹, 赖岳晓¹, 黎巧萍², 田素英^{2,3,Δ}, 刘佩沂¹, 曾永成¹, 李诗¹

(1. 广东省中山市黄圃人民医院, 广东 中山 528429; 2. 广东药科大学, 广东 广州 510006; 3. 广东省实验教学示范中心, 广东 中山 528458)

摘要:目的 探讨英花伤宁口服液的抗炎、抗菌作用。方法 以小鼠棉球肉芽肿试验和醋酸致小鼠腹腔毛细血管炎试验观察英花伤宁口服液的抗炎作用;测定抑菌圈直径、最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。结果 在37.6, 18.8 g/kg剂量下,英花伤宁口服液对小鼠肉芽肿有显著抑制作用,并能显著抑制醋酸所致小鼠腹腔通透性增高;英花伤宁口服液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、伤寒杆菌均有一定抑制作用,不同细菌的MIC为每1 mL 0.014~0.118 g生药, MBC为每1 mL 0.029~0.235 g生药。结论 英花伤宁口服液具有一定抗菌、抗炎作用。

关键词:英花伤宁口服液;抗炎;抗菌;小鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)10-0020-03

Anti-Inflammatory and Antibacterial Effect of Yinghua Shangning Oral Liquid

ZHANG Hongtao¹, LAI Yuexiao¹, LI Qiaoping², TIAN Suying^{2,3}, LIU Peiyi¹, ZENG Yongcheng¹, LI Shi¹

(1. Guangdong Zhongshan Huangpu People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China 528429; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China 510006; 3. Guangdong Provincial Experimental Teaching Demonstration Center, Zhongshan, Guangdong, China 528458)

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory and antibacterial effect of Yinghua Shangning Oral Liquid. **Methods** The anti-inflammatory effect of Yinghua Shangning Oral Liquid was observed by cotton-pellet granuloma in mice and acetic acid-induced abdominal capillary vasculitis in mice. The diameter of inhibition zone, minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC) were determined. **Results** Yinghua Shangning Oral Liquid could significantly inhibit granuloma in mice at doses of 37.6 and 18.8 g/kg, and could significantly inhibit the increase of acetic acid-induced abdominal permeability in mice. Yinghua Shangning Oral Liquid had a certain inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus typha*. The MIC of different bacteria was 0.014-0.118 g crude drug per 1 mL and MBC was 0.029-0.235 g crude drug per 1 mL. **Conclusion** Yinghua Shangning Oral Liquid has a certain antibacterial and anti-inflammatory effect.

Key words: Yinghua Shangning Oral Liquid; anti-inflammatory; antibacterial; mice

*基金项目:广东省中医药局科研项目[20161262]。

第一作者:张洪涛,男,博士研究生,主任医师,研究方向为骨关节外科学,(电话)0760-23210858(电子信箱)femur@163.com。

Δ通信作者:田素英,女,硕士研究生,副教授,研究方向为中药应用与教学,(电子信箱)zsxqtsy@126.com。

trachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin[J]. Gastroenterology, 2003, 125 (6): 1796-1807.

[7] NAKAMURA T, SAKATA R, UENO T, et al. Inhibition of trans 5 forming growth factor β prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats[J]. Hepatology, 2000, 32 (2): 247-255.

[8] ARMENDARIZBORUNDA J, RINCÓNAR, MUNOZVALLEJF, et al. Fibrogenic polymorphisms (TGF- β , PAI-1, AT) in Mexican patients with established liver fibrosis. Potential correlation with pifrenidone treatment[J]. J Invest Med, 2008, 56(7): 944-953.

[9] RALLON NI, BARREIRO P, SORIANO V, et al. Elevated TGF- β levels might protect HCV/HIV-coinfected patients from liver fibrosis[J]. European Journal of Clinical Investigation, 2011, 41(1): 70-76.

[10] FENG J, ZHANG Q, MO W, et al. Salidroside pretreatment attenuates apoptosis and autophagy during hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting the mitogen-activated protein kinase

pathway in mice[J]. Drug Des Devel Ther, 2017, 11: 1989-2006.

[11] HERNANDEZ-MUNOZ R, DIAZ-MUNOZ M, SUAREZ J, et al. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats[J]. Hepatology, 1990, 12(2): 242-248.

[12] WEBER LW, BOLL M, STAMPFL A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model[J]. Critical Reviews in Toxicology, 2003, 33(2): 511-517.

[13] ELSHARKAWY AM, MANN DA. Nuclear factor- κ B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis[J]. Hepatology, 2007, 46 (2): 590-597.

[14] ORFILA C, LEPERT JC, ALRIC L, et al. Immunohistochemical distribution of activated nuclear factor κ B and peroxisome proliferator-activated receptors in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats[J]. Histochemistry and Cell Biology, 2005, 123 (6): 585-593.

(收稿日期:2018-09-12)

英花伤宁口服液为中山市黄圃人民医院名老中医临床验方,由山银花、丹参、黄连、徐长卿等15味中药组方,具有化瘀、消肿、凉血、止痛等功效,临床用于治疗骨折、关节脱臼、扭挫伤肿胀引起的疼痛,疗效确切。为更好地开发应用传统名优验方,本研究中通过抗炎和抗菌试验探讨该制剂的消肿、止痛等作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:SPF级KM小鼠100只,雄性,体质量(20 ± 2)g,购于广东省实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK<粤>2014-1002,饲养于广东药科大学实验室屏障环境饲养间,动物使用许可证号为SCXK<粤>2012-0125,饲养期间自由饮水摄食,室温控制在20℃左右。

菌株:金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、铜绿假单胞菌(ATCC27845)、大肠杆菌(ATCC25922)、痢疾杆菌(ATCC27853)、变形杆菌(ATCC27854)、伤寒杆菌(ATCC25963),由广东药科大学中山校区实验中心提供。

试药:英花伤宁口服液(中山市黄圃人民医院,批号为20170801,规格为每支90 mL);阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司,批号为J20170078,规格为每片100 mg);普鲁卡因青霉素注射液(山东吉星动物药业有限公司,批号为20170801,规格为每支80万U);注射用硫酸链霉素(山东聚德药业有限公司,批号为20170801);营养琼脂、肉汤培养液均购自天津市福星化学试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 抗炎试验

小鼠棉球肉芽肿试验:将50只小鼠分为模型组(A组,等体积0.9%氯化钠溶液)、黄连提取物组(B组)和英花伤宁口服液高、中、低剂量组(C_1 组, C_2 组, C_3 组,37.6,18.8,9.4 g/kg),每组10只。按成人用量(每60 kg体质量270 mL)根据体质量换算法计算小鼠给药量,灌胃体积为每10 g体质量0.2 mL。给予小鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液(每10 g体质量0.03 mL),待其进入麻醉状态后,在每只小鼠左侧腋下涂抹碘酒消毒,再用医用酒精脱碘,皮下部位用手术剪剪开1个小口,用眼科镊子将1个精密称定的灭菌棉球(青霉素和链霉素混合液浸泡,烘干)从切口处植入皮下,随即缝合皮肤,以建立肉芽肿模型。建模成功后各组小鼠灌胃给药,每天1次,连续8 d。末次给药2 h后,脱颈椎处死小鼠,打开原切口,将棉球连同周围结缔组织一起取出,剔除脂肪组织,置烘箱中60℃烘干,称定质量,减去原质量,即得肉芽肿的净质量^[1-2]。

醋酸致小鼠腹腔毛细血管炎试验:分组与给药同

上。连续给药7 d,末次给药30 min后,给予小鼠尾部静脉注射0.5%伊文思蓝0.9%氯化钠溶液(每10 g体质量0.1 mL),随即腹腔注射0.6%冰醋酸0.9%氯化钠溶液(每10 g体质量0.1 mL),20 min后脱臼处死,轻揉小鼠腹部,在小鼠下腹部剪开1个小口,用注射器吸取6 mL 0.9%氯化钠溶液,分数次注入小鼠腹腔中洗涤,收集洗涤液4 mL,加0.9%氯化钠溶液稀释至10 mL,3 000 r/min离心15 min,取上清液,于590 nm波长处测定吸光度^[1-2]。

1.2.2 抑菌试验

抑菌圈测定:分为空白对照组(A组,灭菌水)、黄连提取物(B组)和英花伤宁口服液高、中、低剂量组(C_1 组, C_2 组, C_3 组)。将各菌种置培养基试管中。在培养箱内、于37℃下培养24 h,含菌量为5~10 cfu/mL。吸取100 μ L菌液均匀涂布在营养琼脂平板上,取直径6 mm的无菌圆形纸片,分别吸取各组药液(每片20 μ L),均匀分布在营养琼脂平板表面。于37℃下培养24 h后测量抑菌圈直径。

最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)测定:采用连续倍比稀释法^[3]。取试管9支,设置第1~7支药液质量浓度分别为每1 mL相当0.235,0.118,0.058,0.029,0.014,0.007,0.004 g生药。第8支加入1 mL苯甲酸灭菌溶液(0.1 g苯甲酸溶于1 000 mL蒸馏水),摇匀,作阳性对照。第9支不加试剂,作空白对照。将贮藏菌各取少许分别接种于平板培养基上,37℃培养24 h,活化菌种。挑取单菌落接种与液体培养基上,培养24 h,用灭菌0.9%氯化钠溶液稀释至浓度相当于0.5麦氏比浊管。浊度相同后,稀释1 000倍;各取0.1 mL分别加入各稀释管中,置37℃培养箱中培养24 h,观察各稀释管的变化。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析,计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行F检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗炎试验

与A组比较,B组和 C_1 、 C_2 组小鼠肉芽质量显著减小,腹腔液体中吸光度显著减小($P < 0.05$)。详见表1。

2.2 抑菌试验

低、中、高质量浓度的英花伤宁口服液对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的抑菌作用明显;尤其是高剂量对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌作用强于80%乙醇黄连提取液。结果见表2。

英花伤宁口服液对金黄色葡萄球菌抑菌作用最强,MIC为0.014 g/mL(生药);对伤寒杆菌、铜绿假单胞菌

表1 各组小鼠肉芽质量与吸光度比较($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	肉芽质量(mg)	吸光度
A组		14.300 ± 0.949	0.142 9 ± 0.035 4
B组	0.2	13.300 ± 1.194*	0.051 5 ± 0.008 9*
C ₁ 组	37.6	12.900 ± 1.370*	0.099 9 ± 0.021 6*
C ₂ 组	18.8	13.111 ± 1.453*	0.101 0 ± 0.029 8*
C ₃ 组	9.4	14.125 ± 1.808	0.126 4 ± 0.039 6

注:与A组比较,* $P < 0.05$ 。

表2 各组抑菌结果比较(抑菌圈直径,mm)

菌种	A组	B组	C ₁ 组	C ₂ 组	C ₃ 组
金黄色葡萄球菌		11.48	12.65	11.35	8.45
大肠杆菌		12.54	10.36	8.98	7.87
伤寒杆菌		10.32	10.96	10.67	8.02
铜绿假单胞菌		11.69	12.49	11.08	8.63

表3 英花伤宁口服液 MIC 和 MBC 测定结果

菌种	稀释倍数									MIC	MBC
	2	4	8	16	32	64	128	空白对照	阳性对照	(稀释倍数)	(稀释倍数)
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-(+)	+	+	+	-	32	16
大肠杆菌	-	-(+)	+	+	+	+	+	+	-	4	2
伤寒杆菌	-	-	-(+)	+	+	+	+	+	-	8	4
铜绿假单胞菌	-	-	-(+)	+	+	+	+	+	-	8	4

注:-表示试管澄清,无菌生长;+表示试管混浊,有菌生长;(+)表示继续培养48 h,试管混浊,有菌生长。

广,主要成分小檗碱、黄连碱和巴马汀的抗炎活性较好^[9];徐长卿具有镇痛、抗炎的作用^[10],临床用于治疗各种痛症,对多种炎性模型均有抑制作用,其所含丹皮酚能对抗炎性介质^[11]。方中的其他成分也有一定抗炎、抗菌、镇痛作用,故全方有消肿止痛、活血化瘀功效。

本研究结果显示,37.6 g/kg 和 18.8 g/kg 剂量的英花伤宁口服液能明显抑制棉球肉芽炎性肿胀及冰醋酸所致炎性过程中毛细血管通透性,表明对慢、急性炎性动物模型有抑制作用。对于一些常见细菌,该口服液均有不同程度的抑制作用,其中以金黄色葡萄球菌作用较强,这可能与组方中的山银花、黄柏和蒲公英等的抗菌谱有关^[12-14]。

综上所述,英花伤宁口服液具有一定的抗炎、抗菌作用,但对于其起效浓度、药效物质基础和机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:81.
- [2] 赖岳晓,刘佩沂,田素英,等. 金番止泻胶囊不同比例提取物药效对比研究[J]. 中医学报,2016,31(8):1139-1141.
- [3] 张永明,黄际薇,陶玲,等. 喉咽灵口服液的体外抗菌作用[J]. 中国医院药学杂志,2003,23(3):27-29.

次之,MIC 为 0.058 g/mL(生药);对大肠杆菌作用最差,MIC 为 0.118 g/mL(生药)。结果见表3。

3 讨论

软组织损伤属中医学“伤筋”范畴,究其病机,均属各种原因所致局部气滞血瘀、脉络不和。《圣济总录·折伤门》云:“若因伤折内动经络,血行之道不得宜通。瘀积不散,为肿为痛。”^[4]中医治疗多以活血化瘀为主,效果理想,且避免了长期服用传统非甾体类抗炎药导致多种不良反应的产生^[5-6]。

英花伤宁口服液方中,山银花具有抗炎、抗菌、调节血糖等多种药理作用^[7];丹参作为临床最常用活血化瘀类中药,主要功能为改善微循环、抗炎,其抗炎机制众多,既与直接抗菌作用有关,又与其调节机体免疫功能,从而提高机体抗菌能力有关^[8];黄连的抗菌谱较

- [4] 王衍全,杨豪. 中医筋伤学[M]. 北京:人民军医出版社, 2006:12-14.
- [5] MCGETTIGAN P, HENRY D. Current problems with non-specific COX inhibitors[J]. Curr Pharm Des, 2000, 6(17):1693-1724.
- [6] SHARMA S, PRASAD A, ANAND KS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of pain and inflammation: a basis for drug selection[J]. Am J Ther, 1999, 6(1):3-11.
- [7] 孙森凤,姜雪,褚万春. 金银花药理作用研究进展[J]. 山东化工, 2017, 46(15):58-59.
- [8] 韩浩伦,吴玮. 中药丹参抗炎作用研究进展[J]. 总装备部医学学报, 2010, 12(2):118-119.
- [9] 张海. 黄连碱体外抗炎作用及其机制研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2012.
- [10] 彭长林. 徐长卿水针穴位注射治疗膝关节疼痛32例报道[J]. 甘肃中医, 2001(4):62.
- [11] 金贤兰. 徐长卿药理作用及临床应用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(19):2947-2948.
- [12] 李淑红,王京仁,成钢,等. 12种中草药对金黄色葡萄球菌体外抑菌作用的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(13):148-149.
- [13] 王瑞君. 几种中草药对金黄色葡萄球菌体外抑制作用的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(9):1104-1106.
- [14] 陈蕾,邸大琳. 黄柏体外抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5):759.

(收稿日期:2018-08-30)