

文章编号: 1001-8689(2018)06-0765-07

## 四季青水煎液体外抗内毒素、抗菌和体内抗炎作用

程强<sup>1</sup> 周杨杨<sup>1</sup> 唐炯<sup>2\*</sup> 孙文霞<sup>1</sup> 刘昆<sup>1</sup> 鲁兰<sup>1</sup>

(1 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 四川抗菌素工业研究所, 成都大学, 成都 610052; 2 四川省第二中医医院, 成都 610031)

**摘要:** **目的** 研究四季青水煎液的抗内毒素、抗菌和抗炎作用, 揭示四季青清热解毒作用的药效学特点。 **方法** 采用体外鲎试剂凝集实验方法检测其抗内毒素作用; 采用琼脂二倍稀释法测定四季青水煎液以及与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时对25株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBLs)大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC); 采用二甲苯致小鼠耳廓炎症肿胀法观察其抗炎作用。 **结果** 四季青水煎液在生药浓度6.25~100mg/mL时具有抗内毒素作用; 对受试菌株MSSA、MRSA的MIC范围均为8~33mg/mL, 对产ESBLs大肠埃希菌及非产ESBLs大肠埃希菌的MIC范围均为33~133mg/mL, 对铜绿假单胞菌的MIC为33~133mg/mL; 与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时抗菌活性有相加作用, 分级抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数范围为0.5<FIC $\leq$ 1; 在小鼠口服给药剂量1,280~2,000mg/kg时对小鼠耳肿胀具有抗炎作用。 **结论** 四季青水煎液具有较强的抗内毒素作用和一定的抗炎作用, 对MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌均具有一定的抗菌活性; 与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时抗菌活性具有相加作用; 其清热解毒功能主要以清热作用为主。

**关键词:** 四季青; 水煎液; 抗内毒素; 抗菌; 抗炎; 清热解毒; 体外; 小鼠

中图分类号: R978.1

文献标志码: A

## The anti-endotoxin, antibacterial effects *in vitro* and anti-inflammatory effects *in vivo* of *Ilicis chinensis* folium water decoction

Cheng Qiang<sup>1</sup>, Zhou Yang-yang<sup>1</sup>, Tang Jiong<sup>2</sup>, Sun Wen-xia<sup>1</sup>, Liu Kun<sup>1</sup> and Lu Lan<sup>1</sup>

(1 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotic, Chengdu University, Chengdu 610052; 2 Sichuan Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610031)

**Abstract Objective** To investigate the anti-endotoxin, antibacterial and anti-inflammatory effects of *Ilicis chinensis* folium water decoction (ICFWD) and reveal the pharmacological properties of the clearing-heat and detoxifying effects of *Ilicis chinensis* folium. **Methods** The anti-endotoxin effect of ICFWD *in vitro* was tested using the limulus agglutination assay. Antibacterial effect for the combination of ICFWD *in vitro* with cefotaxime, levofloxacin and gentamicin against 25 strains including methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-producing *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) were also investigated by the agar 2-fold dilution assay. The anti-inflammatory effect of ICFWD was observed by an xylene-induced auricle inflammation model in mice. **Results** ICFWD showed anti-endotoxin effects at doses ranging from 6.25 to 100mg/mL. The minimum inhibitory concentration of ICFWD against MSSA and MRSA, ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-

收稿日期: 2017-06-06

基金项目: 四川省科技厅计划项目(No. 2016JY0077)

作者简介: 程强, 男, 生于1963年, 研究员, 主要从事药动学方向研究, E-mail: chengyaodai@163.com

\*通讯作者, E-mail: jackjiong@163.com

producing *Escherichia coli*, as well as *P. aeruginosa* were 8~33mg/mL, 33~>133mg/mL and 33~133mg/mL, respectively. The combined treatment of ICFWD with cefotaxime, levofloxacin and gentamicin showed additive effects, the fractional inhibitory concentration (FIC) index were  $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ . When orally administrated in mices, ICFWD showed anti-inflammatory effects at doses ranging from 1,280 to 2000mg/kg. **Conclusion** ICFWD exhibited potent anti-endotoxin effects and some anti-inflammatory effects. ICFWD had some antibacterial effects against MSSA, MRSA, ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-producing *Escherichia coli*, and *P. aeruginosa*. The combined treatment of ICFWD with cefotaxime, levofloxacin and gentamicin showed additive effects. It was indicated that the clearing-heat effect acted as the principal action in pharmacological properties of clearing-heat and detoxifying effects of ICFWD.

**Key words** *Ilicis chinensis* folium water decoction(ICFWD); Anti-endotoxin; Antibacteria; Anti-inflammation; Clearing-heat and detoxifying effects; *In vitro*; Mice

细菌耐药性问题对人类的威胁越来越大,新的抗菌药物被发现的速度已经不能跟上细菌耐药性产生的步伐,新型抗生素的发现越来越困难<sup>[1]</sup>。中药是中华民族之瑰宝,用中药进行抗感染治疗具有悠久的历史,中药的特点是组分多、靶点多、药理作用广泛,具有抗菌活性的中药能以多种途径抑制或杀灭细菌,细菌很难有同时针对多种活性成分的突变菌株,因而不产生耐药性<sup>[2-3]</sup>。与西药相比,中药属于由食物衍化而来的自然产物,药食同源,药食相兼,人体对其适应性较强、毒副反应较小<sup>[4]</sup>。从中药(天然产物)中寻找高效低毒、具有抗菌活性的物质可能是应对细菌耐药性问题的一种新的思路的重要途径<sup>[5]</sup>。

四季青(*Ilicis chinensis* folium)为冬青科植物冬青(*Ilex chinensis* Sims)的干燥叶,《中国药典》2015版收载品种,其产地分布广泛,价格低廉,具有清热解毒、凉血止血等功效,临床上常应用于肺热咳嗽、咽喉肿痛、热淋、泻痢和水火烫伤等证候治疗<sup>[6-7]</sup>。现代植物化学研究结果表明,四季青的化学成分以酚酸类化合物和三萜类化合物为主,包含有黄酮类、甾体、挥发油、鞣质和胡萝卜苷等<sup>[8]</sup>,同时,现代药理研究也证实四季青具有抗菌、抗炎等广泛的药理作用<sup>[9]</sup>。目前文献报道的有关四季青的抗菌作用研究较为有限,且多采用标准菌株进行测试,代表性不强,对抗炎作用的研究多为外用,对四季青的抗内毒素研究则未见报道。本文对四季青水煎液的抗内毒素、抗菌和抗炎作用进行了研究,发现四季青水煎液体外具有较强的抗内毒素作用和一定的抗菌和抗炎作用,具有进一步研究的价值。

## 1 四季青水煎液的主要化学成分含量测定

### 1.1 材料与仪器

原儿茶酸对照品(批号: Z30M6L1, 上海原叶生物科技有限公司, 20mg, HPLC $\geq$ 98%), 槲皮素对照品(批号: Y26D5Y1, 上海原叶生物科技有限公司,

20mg, HPLC $\geq$ 98%), 绿原酸对照品(批号: R05F6F1, 上海原叶生物科技有限公司, 20mg, HPLC $\geq$ 98%), 甲醇(Fisher Scientific, 色谱纯), 冰乙酸(成都市科龙化工试剂厂, 分析纯), 蒸馏水(自制), 四季青干燥叶(购自亳州市君源堂药材站, 广西、安徽、河南及河北产地)。LC-10A型高效液相色谱仪(日本岛津公司), N2000色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司), AT-330柱温箱(天津奥特赛恩斯仪器有限公司), 色谱柱为Hypersil BDS-C<sub>18</sub>(200mm $\times$ 4.6mm, 5 $\mu$ m, 依利特), 台式高速离心机(TGL-16B, 上海安亭科学仪器厂), 电子天平(CPA225D, 赛多利斯科学仪器有限公司), 旋涡混合器(XW-80, 上海青浦沪西仪器厂), 低温冰箱(日本索尼公司)。

### 1.2 方法

四季青在中国分布广泛, 主要分布在长江以南地区, 本次选择具有代表性、从南向北地域的广西、安徽、河南及河北产地的药材进行试验。

色谱条件: (1)槲皮素, 流动相为甲醇-0.1%冰醋酸水(45:55), 检测波长254nm; (2)原儿茶酸, 流动相为甲醇-0.1%冰醋酸水(15:85), 检测波长260nm; (3)绿原酸, 流动相为乙腈-水(0.2%三乙胺, 磷酸调pH至2.8)(10:90), 检测波长280nm。槲皮素、原儿茶酸和绿原酸均柱温30℃, 流速1mL/min。

槲皮素、原儿茶酸和绿原酸对照品溶液配制: 精密称取槲皮素、原儿茶酸或绿原酸对照品约5.0mg, 置于5mL容量瓶中, 加各流动相配制成浓度为1mg/mL的溶液, 作为对照品储备液, 用前稀释25倍至0.04mg/mL。

四季青水煎液制备: 分别称取4个产地四季青干燥叶50g, 用洁净纱布包好, 放入煎锅中加入1000mL蒸馏水, 浸泡0.5h后煎煮。先用武火煮沸, 后调至文火煎煮1h; 将药液倒入干净烧杯中, 残渣再加入1200mL蒸馏水, 再次煎煮1h后倒出, 合并两次煎煮液, 继续用文火浓缩致25mL, 得不同产地四季青水

煎液<sup>[10-11]</sup>，其生药浓度为2,000mg/mL，现配现用。

槲皮素、原儿茶酸和绿原酸含量测定：槲皮素、原儿茶酸和绿原酸分别按各自的色谱条件，取相应的对照品溶液，进样10μL；四季青水煎液用蒸馏水稀释25倍，进样10μL。

1.3 结果

槲皮素、绿原酸的线性范围为5~100μg/mL， $R^2$ 分别为0.9992和0.9998，原儿茶酸的线性范围为3.125~100μg/mL， $R^2$ 为0.9997；槲皮素、原儿茶酸、绿原酸的保留时间分别为10.9~11.1、5.7~5.8和11.3~11.6min。

采用外标法计算得到4个产地四季青干燥叶中槲皮素含量为0.008%~0.015%，安徽产最高；原儿茶酸含量为0.017%~0.489%，河北产最高；绿原酸含量为0.056%~0.340%，河北产最高；以河北产四季青干燥叶中槲皮素、原儿茶酸和绿原酸含量总体较高(表1)。

表1 4个产地四季青水煎液中主要化学成分含量(%)

Tab. 1 The concentration of the principal chemical components in *Ilicis chinensis* folium water decoction from four different areas (%)

主要成分	广西	安徽	河南	河北
槲皮素	0.008	0.015	0.011	0.013
原儿茶酸	0.176	0.344	0.017	0.489
绿原酸	0.056	0.262	0.093	0.340

2 四季青水煎液体外抗内毒素作用

2.1 材料与仪器

四季青水煎液(同“1.2”项)，冻干大肠埃希菌内毒素标准品(批号：1612010，湛江安度斯生物有限公司，10EU/支)，鲎试剂(批号：1702131，湛江安度斯生物有限公司，0.1mL/支，0.5EU/mL)，细菌内毒素检查用水(批号：1701190，湛江安度斯生物有限公司，5mL/支)。灭菌锅(LDZX-75KB，上海申安医疗器械厂)，生物安全柜(HFsafe 1200/C，Class II，Type A/B3，力康发展有限公司)，低速离心机(1500型，湘江仪器厂)，电热恒温水浴锅(北京市医疗设备厂)，移液枪(100~1000μL)，无热原一次性注射器(常州悦康医疗器械有限公司，批号：160914，1mL；批号：160808，5mL)。

2.2 方法

前处理及样品准备：将玻璃制品用洗液浸泡一夜，取出后蒸馏水洗净，250℃干热灭菌1h备用；取4个产地2000mg/mL四季青水煎液用无菌水稀释，分别配制得到浓度100、50、25、12.5、6.25和3.13mg/mL受试溶液，现配现用。

鲎试剂灵敏度按《中国药典》2015年版四部方

法复核，测定值符合规定后可用于实验。将内毒素标准品用1mL内毒素检查用水溶解，得到10EU/mL的溶液，涡旋混合3min，取0.3mL加入2.7mL内毒素检查用水中，涡旋混合1min，得到1EU/mL的内毒素溶液，备用。取此1EU/mL的内毒素溶液0.1mL分别加入到0.1mL的各浓度四季青水煎液中，摇匀，37℃水浴30min，冷却至室温后取0.1mL加入至含0.1mL鲎试剂白色透明小瓶中，盖好瓶盖，摇匀，做为受试组。另取0.1mL内毒素溶液，直接加入到含0.1mL鲎试剂小瓶中，做为阳性对照；取内毒素检查用水0.1mL，加入到含0.1mL鲎试剂小瓶中做为阴性对照。受试组与阳性对照组和阴性对照组同时于(37±1)℃水浴温孵(60±1)min，小心从水浴锅中取出，缓缓倒转180°观察，若管内凝胶不变形，不从管壁滑脱者视为产生凝集的阳性反应，无拮抗内毒素作用，计为“+”；若管内凝胶变形，不能保持完整而从管壁滑脱者视为不产生凝集的阴性反应，有拮抗内毒素作用，计为“-”。在拿取过程中应避免剧烈振动，防止出现假阴性结果，结果可信的前提必须满足阳性对照管形成坚实凝胶和阴性对照管仍为流动性液体<sup>[12]</sup>。

2.3 结果

4个产地四季青水煎液在浓度25~100mg/mL时均具有较强的拮抗内毒素作用，最低能抑制内毒素的浓度为6.25~25mg/mL，其中以安徽产四季青最强，河北产四季青次之(表2)。

3 四季青水煎液体外抑菌作用

3.1 4个产地四季青水煎液体外抑菌作用

3.1.1 材料与仪器

质控菌株：金黄色葡萄球菌ATCC29213、大肠埃希菌ATCC25922、铜绿假单胞菌ATCC27853购自中华人民共和国卫生部临床检测中心。临床分离致病菌株：甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)5株，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)5株，产ESBLs大肠埃希菌5株、非产ESBLs大肠埃希菌5株，铜绿假单胞菌5株(来自成都大学附属医院，在收集单位经VITEK-60自动微生物鉴定仪鉴定再经本实验室用常规方法重新鉴定)，MH(A)培养基(批号：20160218，北京奥博星生物技术有限责任公司)。

药品和试剂：四季青水煎液(同“1.2”项)，美罗培南(批号：150705，海口市制药厂有限公司)。

仪器：灭菌锅(LDZX-75KB，上海申安医疗器械厂)，生物安全柜(HFsafe 1200/C，Class II，Type A/B3，力康发展有限公司)，低速离心机(1500型，湘江

表2 4个产地四季青水煎液抗内毒素作用(mg/mL)  
Tab. 2 Anti-endotoxin effects of *Illicis chinensis* folium water decoction from four places (mg/mL)

产地	水煎液浓度						阴性	阳性
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	对照	对照
广西	-	-	-	+	+	+	-	+
安徽	-	-	-	-	-	+	-	+
河南	-	-	-	+	+	+	-	+
河北	-	-	-	-	+	+	-	+

注：“-”为不产生凝集反应，对内毒素有拮抗作用；“+”为产生凝集反应，对内毒素无拮抗作用；阴性对照为内毒素检查用水，不含内毒素，阳性对照为含内毒素溶液

仪器厂)，隔水式恒温培养箱(GNP-9080，太仓精宏仪器设备有限公司)，电子天平(CPA225D，赛多利斯科学仪器有限公司)，电子天平(BS224S，赛多利斯科学仪器有限公司)，移液枪(100~1000μL，Finntiteppe)，多点接种仪(Denley A 400)，电热恒温水浴锅(北京市医疗设备厂)，电磁炉(苏泊尔)，麦氏比浊管。

3.1.2 方法

采取美国国家临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的琼脂二倍稀释法测定四季青水煎液对实验菌株的体外最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。设定阳性对照药美罗培南浓度按二倍稀释在0.008~128μg/mL范围内，称取美罗培南9.58mg，加入5mL蒸馏水，配制成1.92mg/mL的溶液作为阳性对照溶液；设定各产地2,000mg/mL四季青水煎液浓度按二倍稀释在1~133mg/mL范围内，作为受试溶液。分别取各产地四季青水煎液或美罗培南溶液1mL，加入50℃融化的MH(A)培养基14mL，混匀，待冷却后用多点接种仪分别接种25株MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假

单胞菌，菌液浓度约为10<sup>6</sup>CFU/mL，经35℃ 18~20h培养后观察对细菌的抑制作用，进行MIC测定。

3.1.3 结果

广西、安徽、河南、河北产地四季青水煎液对MSSA、MRSA的MIC基本一致，均为8~33mg/mL；对产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌的MIC也基本一致，均为33~>133mg/mL；对铜绿假单胞菌的MIC为33~133mg/mL。对革兰阳性菌(如金黄色葡萄球菌)的抑制活性以广西产四季青最佳，对革兰阴性菌(如大肠埃希菌和铜绿假单胞菌)的抑制活性以河北产四季青最佳(表3)。

3.2 四季青水煎液与犬空白血浆孵化后体外抑菌作用

3.2.1 材料与仪器

空白犬血浆新鲜采自beagle犬，其余同“3.1.1”项。

3.2.2 方法

根据4个产地四季青水煎液的体外抑菌作用结果，选择综合抑菌活性最强的河北产四季青水煎液1mL，加入新鲜犬空白血浆1mL，混匀，分别在37℃水浴孵化0.5、1、1.5和2h后取出，加入50℃融化的MH(A)培养基13mL，混匀，同“3.1.2”项接种细菌、进行培养，观察对细菌的抑制作用，进行MIC测定。

3.2.3 结果

河北产四季青水煎液与犬空白血浆分别孵化0.5~2h后进行MIC测定，结果对MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的抗菌活性未发生明显改变，MIC范围对MSSA、MRSA分别为8~33和8~17mg/mL，对产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌均为66~133mg/mL，其抗菌活性与孵化时间的长短无关(表4)。

3.3 四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大

表3 四季青水煎液对MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的MIC<sub>R</sub>  
Tab. 3 The MIC<sub>R</sub> values of *Illicis chinensis* folium water decoction of different provinces against MSSA, MRSA, ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-producing *Escherichia coli*, and *P. aeruginosa*

菌株	省份/(mg/mL)				美罗培南/(μg/mL)	菌对照
	广西	安徽	河南	河北		
MSSA(5株)	8	17	17~33	8~17	0.03~0.125	+
MRSA(5株)	8	17	17~33	8~17	0.03~16	+
产ESBLs大肠埃希菌(5株)	33~66	33~66	133~>133	33	<0.008~0.015	+
非产ESBLs大肠埃希菌(5株)	33~>133	33~66	133~>133	33	<0.008~0.015	+
铜绿假单胞菌(5株)	33~133	66	66~133	33	0.125~0.25	+
ATCC29213(1株)	8	17	33	8	0.03	+
ATCC25922(1株)	66	33	>133	33	0.015	+
ATCC27853(1株)	66	66	66	33	0.25	+

注：ATCC29213、ATCC25922和ATCC27853分别为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的质控株

表4 四季青水煎液与犬血浆孵化不同时间后对MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的MIC<sub>R</sub>

Tab. 4 The MIC<sub>R</sub> values of *Ilicis chinensis* folium water decoction incubated with blank plasma of different time against MSSA, MRSA, ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-producing *Escherichia coli*, and *P. aeruginosa*

菌株	时间/(mg/mL)				美罗培南/(μg/mL)	菌对照
	0.5h	1h	1.5h	2h		
MSSA(5株)	17~33	8	17~33	8	0.03~0.125	+
MRSA(5株)	17	8	17	8	0.03~16	+
产ESBLs大肠埃希菌(5株)	66~133	66	66	66	<0.008~0.015	+
非产ESBLs大肠埃希菌(5株)	66~133	66~133	66~133	66~133	<0.008~0.03	+
铜绿假单胞菌(5株)	133	66~133	66~133	66~133	0.125~0.5	+
ATCC29213(1株)	17	8	17	<4	0.03	+
ATCC25922(1株)	56	56	56	28	<0.008	+
ATCC27853(1株)	56	56	56	28	0.125	+

注：ATCC29213、ATCC25922和ATCC27853分别为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的质控株；美罗培南为阳性对照，未进行孵化

霉素联合使用时体外抑菌作用

3.3.1 材料与仪器

河北产四季青水煎液，注射用头孢噻肟钠(批号：141202B，四川制药股份有限公司，1.0g)，盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液(批号：C16062401-1，四川科伦药业股份有限公司，100mL/瓶，含左氧氟沙星0.2g，氯化钠0.9g)，硫酸庆大霉素注射液(批号：20140618，河南天方药业股份有限公司，2mL，8万单位)，其他同“3.1.1”项。

3.3.2 方法

用琼脂二倍棋盘稀释法，每次实验取36个培养皿，按6×6(列×行)排序。于1~5列中分别加入1~2mL不同浓度的河北产四季青水煎液，第6列中加入1mL抗生素，均加至第5行止；于1~5行中分别加入1mL不同浓度的抗生素，第6行中加入1mL四季青水煎液，均加至第5列止；第6列中的第6行不加入药液，做为空白菌对照。分别加入50℃融化的MH(A)培养基，使总体积为15mL，混匀，使1~5列中四季青水煎液的浓度为对应MIC的2、1、1/2、1/4和1/8倍，第6列中抗生素浓度为2MIC，1~5行中抗生素的浓度为对应MIC的2、1、1/2、1/4和1/8倍，第6行中四季青水煎液的浓度为2MIC。冷却后用多点接种仪分别接种MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌和非产ESBLs

大肠埃希菌菌液，菌液浓度约为10<sup>6</sup>CFU/mL，经35℃18~20h培养后观察对细菌的抑制作用。以分级抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FIC)进行判断，FIC=(四季青联用时的MIC/四季青单用时的MIC)+(抗生素联用时MIC/抗生素单用时的MIC)。当FIC≤0.5为协同作用，0.5<FIC≤1为相加作用，1<FIC≤2为无关作用，FIC>2为拮抗作用作[13-14]。

3.3.3 结果

河北产四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时对20株MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌和非产ESBLs大肠埃希菌的FIC值均在0.5~1(含1)，只具有相加用。表明四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用对各自的抑菌活性没有明显改变(表5)。

4 四季青水煎液对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

4.1 材料与动物

河北产四季青水煎液，氟比洛芬(四川抗菌素工业研究所，99.9%)，羧甲基纤维素钠CMC(批号：F20090508，国药集团化学试剂有限公司)，二甲苯(成都市科龙化工试剂厂，分析纯)。SPF级昆明种雄性小鼠，体重18~20g，购自成都达硕生物科技有限公司，合格证号：SCXK(川)2015-030。

4.2 方法

表5 四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时的FIC(n=5)

Tab. 5 The FIC values of combined treatment of *Ilicis chinensis* folium water decoction with cefotaxime, levofloxacin and gentamicin (n=5)

试药	MSSA	MRSA	产ESBLs大肠埃希菌	非产ESBLs大肠埃希菌
四季青水煎液+头孢噻肟	0.75~1	>0.5~0.75	>0.5~0.75	>0.5~0.75
四季青水煎液+左氧氟沙星	>0.5~0.75	0.75~1	0.75~1	0.75~1
四季青水煎液+庆大霉素	>0.5~1	0.75~1	0.63~0.75	0.75~1

注：FIC≤0.5为协同作用，0.5<FIC≤1为相加作用，1<FIC≤2为无关作用，FIC>2为拮抗作用

取河北产四季青水煎液用蒸馏水稀释，分别配制得到浓度为64、80和100mg/mL溶液，做为受试溶液。取40只小鼠随机分为5组，每组8只，分别为阴性对照组(生理盐水)，阳性对照组(氟比洛芬60mg/kg)和四季青水煎液低、中、高(1,280、1,600和2,000mg/kg)剂量组。各组动物给药体积为每10g体重0.2mL，四季青水煎液各剂量组、氟比洛芬组和生理盐水组，每日给药1次，连续灌胃2d，末次给药后各组动物左耳内外侧各滴50μL二甲苯溶液，4h后将小鼠脱颈椎处死，沿耳廓基线解剖位置剪下双耳，用直径为8mm打孔器取动物双耳耳片称重，左、右耳片重量之差为肿胀度，结果用SPSS软件统计处理。

表6 四季青水煎液对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab. 6 The effects of *Ilicis chinensis* folium water decoction on auricle swelling in mice

组别	药物	剂量	耳肿胀度/mg
阴性对照组	生理盐水	20mL/kg	19.13±3.04
低剂量组	四季青水煎液	1,280mg/kg	11.50±3.82*
中剂量组	四季青水煎液	1,600mg/kg	8.63±3.71*
高剂量组	四季青水煎液	2,000mg/kg	10.25±4.37*
阳性对照组	氟比洛芬	60mg/kg	7.63±4.57*

注：“\*”为与阴性对照组比较，经t检验， $P<0.05$

4.3 结果

四季青水煎液对二甲苯致小鼠耳肿胀结果显示，与阴性对照组比较，阳性对照组和四季青水煎液各剂量组的耳肿胀度均明显降低，有显著性差异( $P<0.05$ )，四季青水煎液对二甲苯致小鼠耳肿胀有抑制作用的最低剂量为1280mg/kg，量效关系不明显(表6)。

5 讨论

4个产地四季青水煎液在浓度6~100mg/mL时具有较强的体外抗内毒素作用，为排除pH变化的影响，实验中分别使用了PBS缓冲液、内毒素检查用水和不同PH缓冲溶液稀释四季青水煎液，结果四季青水煎液体外在pH5.0~8.0时对内毒素均有拮抗作用，在此范围内pH变化无影响，体内抗内毒素作用则有待动物实验验证。

不同产地四季青水煎液均具有一定的抗菌活性，对MSSA、MRSA较好，对产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌相对较弱，大部分均在33~133mg/mL之间，与《中国药典》2015版四季青临床用量15~60g/次，以及在此剂量下产生的体内抗菌活性浓度有何关联，尚不明确。四季青水煎液与犬空白血浆在37℃的孵化实验表明血浆中

的酶对四季青水煎液成分的代谢未能明显影响其抗菌活性，推测其抗菌活性不是由代谢物产生，但此项实验并非体内实验，不能完全反映药物在体内真实的代谢过程。四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用实验表明，对各自的抑菌活性没有明显改变，提示与传统抗生素联合应用无协同作用。

在抗炎实验的剂量选择中，参考文献报道，四季青水煎液小鼠外用抗炎的浓度低、中、高分别为500、1000和1500mg/mL，给药剂量分别为1250、2500和3750mg/kg<sup>[12,16]</sup>，而按《中国药典》2015版四季青临床口服剂量换算成小鼠口服剂量为250~9000mg/kg，本次实验四季青水煎液浓度选择为2000mg/mL，小鼠口服剂量低、中和高分别为1280、1600和2000mg/kg，其中高剂量为小鼠口服四季青水煎液LD<sub>50</sub> 7200mg/kg的0.3倍，接近动物不发生死亡的最高剂量，结果3个剂量组及阳性组与阴性组比较均具有显著性差异( $P<0.05$ )，表明四季青水煎液具有一定的抗炎作用，与文献[15-16]报道一致，但量效关系不明显，是否与本次实验预先给药天数不够(只预先给药2d，通常需连续给药3d以上)，各剂量组间距较窄和抗炎作用的强度不稳定有关，还有待进一步实验。

本文对4个不同产地四季青水煎液中主要化学成分槲皮素、原儿茶酸和绿原酸的含量进行了测定。结果显示，四季青水煎液抗内毒素作用的强弱与槲皮素的含量高低有一定的关联性，抗菌作用的强弱与原儿茶酸和绿原酸的含量高低有一定的关联性，但这几种成分是否就是四季青水煎液的药效物质基础，或者是药效物质基础之一，或者是需要其他的成分辅助才能发挥作用，还有待进一步研究。

四季青药材在《中国药典》和中药教科书中均被归为典型的清热解毒类中药，而中医“热毒”的物质基础很大程度上为能影响内毒素释放的成分，是清热解毒的科学实质<sup>[17]</sup>。同时，清热解毒中药除抗微生物、中和内毒素外，还能够对机体进行免疫调节，抑制炎症介质的合成和释放，从而改善炎症对组织的损害<sup>[18]</sup>。现阶段临床上清热解毒中药多以水煎服汤剂为主，不适合治疗重、急症感染患者，但因其药理活性多样，除作为中药使用外，也可将其与西药抗生素搭配使用，既可发挥西药较强的抗菌作用，又可发挥清热解毒、增强免疫、清除内毒

素等作用,做到“内外毒素”并治<sup>[19-20]</sup>。四季青清热解毒的药效作用比较确定,但其各药理作用的物质基础还不够明确,本文以四季青为代表,探索清热解毒类中药药理作用的多样性,结果显示,四季青水煎液具有一定的抗内毒素、抗菌和抗炎作用,其中抗内毒素作用较强,是四季青水煎液的主要药理作用,可用于临床抗生素治疗时的清热解毒,对四季青的临床应用和药效物质基础研究均具有一定的参考价值。

### 参考文献

- [1] Spellberg B, Powers J H, Brass E P, *et al*. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future[J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(9): 1279-1286.
- [2] 聂广. 中西医结合传染病研究的目标与任务[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(9): 842-845.
- [3] 李芳芳. 冰片与抗菌药物体外联合抗菌作用的研究[D]. 广州: 广东药学院, 2014.
- [4] 黄圣源. 从中西医对中医药的认识差异谈中医药在全球的发展[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [5] 刘昌孝. 当代抗生素发展的挑战与思考[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(1): 1-12.
- [6] 李松, 郭淑珍, 王建松. 清热解毒的四季青[J]. 首都食品与医药, 2016, 23(7): 64.
- [7] 张玉梅, 李春华, 盛秀涛. 中药四季青的化学成分研究[J]. 吉林中医药, 2010, 30(3): 252-253.
- [8] 甄汉深, 李生茂, 董佳梓. 四季青化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2007, 24(6): 18-20.
- [9] 夏文绮, 崔保松, 李帅. 四季青化学成分的研究[J]. 中草药, 2016, 47(8): 1272-1277.
- [10] 屈巧玲, 杨滨, 王谦鹏, 等. 四季青药材HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(22): 1699-1703.
- [11] 张伟奇, 张梦飞, 席鹏, 等. 四季青水煎液外用抗炎作用[J]. 中医学报, 2016, 31(8): 1146-1149.
- [12] 曹艳, 崔瑞勤, 陈科力, 等. 利胆排毒口服液不同极性部位体外抗内毒素作用研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(2): 48-49.
- [13] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 120-152.
- [14] 王月玲. 黄连素联合头孢他定对产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌抑菌作用的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2005.
- [15] 覃仁安, 陈敏, 梅璇, 等. 四季青水提液和乙醇提取液对小鼠急性炎症的影响[J]. 贵州医药, 1999, 23(6): 416-417.
- [16] 应利晏. 四季青治疗单纯型慢性化脓性中耳炎92例[J]. 中国全科医学, 2000, 3(3): 219-219.
- [17] 刘仰东. 抗生素诱导内毒素血症的研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(9): 1006-1009.
- [18] 唐德才. 清热解毒药的优势与特色[C]. 临床中药学学术研讨会, 2009: 49-52.
- [19] 邓文龙, 徐嘉红, 王文烈, 等. 热毒平的抗内毒素作用研究[J]. 中药药理与临床, 1995, 3(2): 16-19.
- [20] 唐庆芝, 魏长志. 清热解毒药与抗菌、抗病毒药的抗感染作用分析[J]. 河北中医, 2013, 35(6): 910-911.