

天然药物抑菌活性实验方法的研究概述

冉棋¹, 赵卓卓¹, 刘秀琨¹, 禹鹏鑫¹, 梁利鹏², 李纳纳¹, 宋新波^{3,4}, 李薇^{1*}

(1. 天津中医药大学, 天津 301617; 2. 北达苁蓉(天津)生物科技有限公司, 天津 300000;
3. 天津中一制药有限公司, 天津 301617; 4. 天津现代创新中药科技有限公司, 天津 300191)

[摘要] 抗生素的抑菌抗炎效果作用明显,但其毒性作用、所引起的二次感染及细菌的耐药性等问题已成为全球性问题。中草药一直是我国的传统文化及民族特色的瑰宝,在抑制细菌生长、杀灭病原菌的作用上也有显著功效。针对此类天然药物的抑菌活性实验已逐步成为研究热点,但天然药物自身特殊性会因方法选择的不同而产生差异,因此,不同的天然药物抑菌实验方法也应与不同类别的药物相匹配。该文通过收集整理国内外相关文献,系统归纳了当下常用的天然药物体外、体内和体内外联合抑菌活性实验方法,分析了各个抑菌方法应用过程中的优势、劣势,发现不同类别天然药物的适用方法各异,并对各实验方法操作提出了相关建议,以期天然药物抑菌敏感性研究方法的选择提供思路,并为解决抗生素滥用问题提供新方案。

[关键词] 耐药性; 天然药物; 中药; 药物敏感性; 抑菌试验; 体内外; 抗生素
[中图分类号] R22;R37;R28;R93;R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0214-08
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191051
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190128.0915.001.html>
[网络出版时间] 2019-01-29 9:01

Overview of Experimental Methods for Antimicrobial Activity of Natural Drugs

RAN Qi¹, ZHAO Zhuo-zhuo¹, LIU Xiu-kun¹, YU Peng-xin¹, LIANG Li-peng²,
LI Na-na¹, SONG Xin-bo^{3,4}, LI Wei^{1*}

(1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;*
2. *Beida Cistanche (Tianjin) Biotechnology Co. Ltd., Tianjin 300000, China;*
3. *Tianjin Zhongyi Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 301617, China;*
4. *Tianjin Modern Innovative Chinese Medicine Technology Co. Ltd., Tianjin 300191, China)*

[Abstract] The antibiotics have obvious antibacterial and anti-inflammatory effects, but their toxic side effect, secondary infection and bacterial resistance have become a global problem. Traditional Chinese medicine (TCM) has always been the treasure of traditional culture and national characteristics in China since ancient times. It also has remarkable effect on inhibiting the growth of bacteria and killing pathogenic bacteria. The research on bacteriostatic experiment of TCM has gradually become a hot topic. Sensitivity experiments for such natural medicines have gradually become a research hotspot, but the complexity and particularity of natural medicines will vary with different methods. Therefore, different methods of drug sensitivity experiments should be matched with different natural drugs. By collecting and sorting out the relevant literature at home and abroad, this paper systematically summarizes the commonly used *in vitro*, *in vivo* and their combination bacteriostasis experimental methods of natural medicine activity, analyses the advantages and disadvantages of each method in the process of

[收稿日期] 20181208(005)
[基金项目] 天津市科技计划项目(15PTCYSY00030)
[第一作者] 冉棋,在读硕士,从事中药药剂学研究,E-mail:584902283@qq.com
[通信作者] *李薇,硕士,助理研究员,从事中药学研究,E-mail:cheercathy@163.com

application, finds that different kinds of natural drugs have different applicable methods, and puts forward suggestions for the operation of each experimental method, in order to provide ideas for the selection of antibacterial susceptibility research experiments of natural medicines. It also provides a reliable reference method for solving the problem of antibiotic abuse and the development and utilization of natural medicines.

[**Key words**] drug resistance; natural medicines; traditional Chinese medicine; drug sensitivity; bacteriostasis test; *in vitro* and *in vivo*; antibiotics

近二十余年来,由于抗生素的滥用,细菌耐药现象越来越普遍,铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*),肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) 占临床分离出的耐药病原微生物的 70% 到 80%。细菌耐药的一个严重后果是由于抗生素的不敏感,导致患者的感染不能得到及时的控制,甚至出现死亡。世界卫生组织 2017 年 9 月发布报告^[1]指出,目前新抗生素的开发严重不足,难以打击日益增长的抗微生物药物耐药性威胁。新品种抗生素的匮乏和逐年加重的细菌耐药导致的剪刀差为未来感染性疾病的治疗蒙上了一层阴影。

面对严峻的抗生素耐药的现状,非抗生素治疗感染性疾病的理念逐步得到认同并进行了卓有成效的研究。中药作为中国传统医学发展的结晶,已有悠久的历史,很多药材经过临床验证都具有非常好的抑菌抗炎的效果,而且中药往往具有作用靶点多、抑菌谱广、毒副作用小、不易产生耐药性的特点^[2],具有可以延缓甚至逆转细菌产生耐药性的优势。

研究天然药物的抗菌抗炎活性,选择合理的药物敏感性测定方法对其活性进行科学、高效评价就变得非常重要。加之中药往往具有溶解度、透光度较差的特点,常用于测定化学药物敏感性的方法应用于中药研究中往往不能得到很好的结果。但未有前人在此进行分析总结以及论述。本文通过综述不同天然药物敏感性试验方法在中药抗菌活性实验中的应用实例,论述了天然药物敏感性试验方法的选择思路。中药抑菌的敏感性实验方法主要有体外抑菌实验方法、体内抑菌实验方法和体内外联合抑菌实验方法,其中常见的体外抑菌方法有液体培养基法、固体培养基法和高通量筛选法;体内抑菌实验方法有临床治疗模拟法和增强机体机能法。

1 体外抑菌敏感实验方法

1.1 液体培养基法 液体培养基法是指采用液体类营养培养基进行细菌培养的一类方法,常见的有

比浊法、微量肉汤稀释法和营养物质消耗法。此类方法操作较为简便、结果观测较为直观。

1.1.1 比浊法 比浊法通过观察药液浊度来判断药物的抑菌敏感性,该方法适用于中药汤剂及原料药材的抑菌敏感性考察。曲径等^[3]采用该方法研究 20 种中药对禽多杀性巴氏杆菌的抗菌活性。杨露等^[4]运用该方法研究麻黄附子细辛汤与抗生素联合后对体外抗大肠埃希菌的敏感性作用。于蓓蓓等^[5]采用该方法对黄芩的抑菌活性进行测定,为其精制工艺的优选提供了参考。

1.1.2 微量肉汤稀释法 微量肉汤稀释法一般选用 96 孔聚苯乙烯板,相比常量肉汤稀释法,该法所需的药液量、培养基量以及菌量都较少,且可以在同一块板上观察多个药物浓度对同种菌的生长抑制作用^[6]。蔡伟等^[7]采用该方法对大黄等 15 种中药材的银纳米颗粒制品进行抑菌敏感性测定,考察了中药材新剂型的抑菌活性优势。该方法还可加入显色剂如噻唑蓝 (MTT)^[8] 和氯化三苯四氮唑 (TTC)^[9],由不同程度的显色表示其抑菌程度。微量肉汤稀释法的缺点是不易判断自身颜色较深的中药是否有抑菌活性。由于检测过程时间短,且准确度较高,国内外研究者大多选用该方法研究抑菌效果较好、透光率较高的中药成分^[10-17];根据不同检测时间的结果,绘制出的生长曲线也可帮助学者研究药物的抑菌活性机制^[18]。因此,微量肉汤稀释法是现代抑菌活性药物筛选的首要方法。

1.1.3 营养物质消耗法 该法根据待测菌生长过程中营养物质的消耗量来体现其生长情况。目前的研究中常测定葡萄糖^[19]或蛋白质的含量作为考察标准。但由于某些中药自身成分较复杂,在培养过程中,可能有糖类或蛋白质相关成分的溶出,进而影响营养物质剩余量的测定。因此,在运用该方法测定某药物的抑菌敏感性时,建议检测多个指标,以有助于保证分析结果的准确性。

1.2 固体培养基法 固体培养基法是指采用琼脂类培养基进行细菌培养的一类方法,常见的有扩散法、菌落计数法和药敏板法。此类方法操作简单、

重复性高、结果稳定。

1.2.1 扩散法 该方法中药物对细菌的敏感性研究结果受多种因素影响,如培养基的质量与厚度、药物扩散程度、接种菌量及菌活力、孵育培养条件等。扩散法的优势是操作简单、低耗材、适用药物范围广、结果明显易判读^[20]。扩散法主要有纸片法、牛津杯法、平皿法等。

纸片法是常用且经典的抑菌实验方法,该法的优点是药物的装载量小,可以在同一平皿上观察一种细菌对多种中药成分^[21-22]或者多个不同浓度药液的敏感性或耐药性^[23],结果直观,易于判断。可筛选对病原微生物活性高^[24]、特异性强、对待测环境稳定、溶解性较好的天然药物。其缺点是所测得的抑菌敏感性不够精确,方法自身可能存在影响结果的外在因素,如含药液纸片的烘干温度和时间。在中药的抑菌敏感性考察时,其提取液普遍为悬浊液,成分较复杂,比如丁香、厚朴、苍术^[25]的抑菌活性成分为挥发油,载药纸片在干燥过程中可能会导致有效成分挥发,进而影响试验结果的准确性。

牛津杯法又称为管碟法、杯碟法,是国内外经常用的检测方法,结果直观且重复性好,可以在较短的时间内完成大量中药的筛选;但需要特制的牛津杯,某些中药由于浓度较高,使药物向菌层中渗透扩散不均匀,造成得到的抑菌圈不规则。牛津杯法的结果主要取决于琼脂培养基内的药物扩散性和有效成分的溶解性,是初步筛选抗菌天然药物^[26-27]的有效途径,可作为一种定性的研究方法。彭璐等^[28]用该方法研究了不同制备工艺下百药煎的抑菌敏感性,为其最优制备工艺的选择提供了参考。

平皿法主要有打孔法和挖沟法。该类方法类似于牛津杯法,对浓度较高、成分较复杂的中药溶液,该方法更利于药物扩散。适用于含有皂苷、挥发油类抑菌活性的天然药物检测。但在测定某些快速生长或传播的病原菌的抗菌活性时,扩散效果不易控制。运用打孔法时,抗菌环中经常形成薄菌苔,影响对结果的判断;且打孔时琼脂易因操作而破裂,须要求熟练掌握打孔技术。打孔法的优势是可同时检测同一菌种对不同待测药物的敏感度或耐药性,操作简单、成本低、结果直观、易于判断和比较,常作为定性判断的实验方法。经整理统计发现,打孔法可筛选不同中药^[29-32]及皂苷^[33]、挥发油^[34]类等中药成分^[35]的抑菌活性。挖沟法是在琼脂平皿中间挖 1 条宽 5 ~ 10 mm 的沟,加入待测药液后再划一条垂直药沟的接种线,每个平皿可同时检测同一菌种对

不同浓度药物^[36]或者同一药物对不同受试菌的抑菌敏感性^[37-38]。对于不溶性天然药物可以选择该方法,但应注意加药液的量,以防止渗出药槽;划接种线也应当均匀连续,这样才可保证抑菌效果的呈现。

1.2.2 菌落计数法 菌落计数法通过菌落数的多少来反映其生长情况,抑菌率的计算公式为抑菌率 = (对照皿菌落数 - 试验皿菌落数) / 对照皿菌落数 × 100%,适用于大多数药物的抑菌敏感性测定。骆琦^[39]运用菌落计数法测定产芽孢菌的杀菌效果。张超等^[40]利用菌落计数法测定了药物对待测菌作用后的活菌数以判断药物抑菌敏感性。邓新焕等^[41]通过该方法检测抑菌率来评价复方用药的抑菌敏感性。

1.2.3 药敏板法 药敏板法的优点是可以同时检测不同中药提取物^[42-44]对各细菌的抑制生长作用效果,也可用于药物抑菌活性或者耐药性的筛选^[45-46]。该方法有较好的重复性,并且在结果中可发现污染菌株或耐药突变株,操作比较简单、价格低廉,是验证新药体外抗菌药物敏感性的常用参考标准^[47],可适用的中药成分范围广。但运用该方法筛选大量抑菌活性药物时,因需要制备含药琼脂平板而费时费力,工作量较大。

1.3 高通量筛选法 高通量筛选法是快速研究细菌鉴定及药物敏感性的实验方法。该类方法操作简便、检测流程周期短、分析精确,实现了高通量检测和筛选,克服了传统抗菌活性筛选过程中费时、费力、费料的弊端,是目前考察药物对细菌敏感性研究中的新型、热门实验方法。

1.3.1 全自动药敏法 该方法所用的较高程度自动化仪器具有操作简便、容易维护、检测耗时短、结果精确度高、重复性好等优点,能大大减少科研人员的工作量。但该方法在药物的选择上不够灵活,仪器以及所用试剂成本较高。王偲^[48]运用全自动微生物系统,通过测定肺炎链球菌的最低抑菌浓度来评价药物的抑菌敏感性,结果发现该方法检测速度与报告时间均优于传统抑菌方法。

1.3.2 流式细胞术 流式细胞术 (FCM) 采用流式细胞仪对单个细胞或其他生物微粒进行快速定性、定量分析与分选,可在描述粒子形态的同时,测量抗原性生物微粒以及生物变化的相关性^[49],是一种新的药敏监测方法。经查阅文献发现,FCM 已在药物的抑菌敏感性研究中得到了应用^[50-53]。有研究表明流式细胞仪可以作为一种检测精油对单核细胞

增生的李斯特氏菌的抗菌敏感性工具^[50]。该方法还可以检测抗菌素的耐药性和评估影响破坏微生物生长活力的细胞分子^[54]。其优势是大大缩短了常规检测药物抑菌敏感性的时间,测量的结果有较高的可重复性;其缺点是流式细胞仪检测设备较为昂贵,导致运用此方法检测抑菌药物的敏感性还不能得到广泛应用。

1.3.3 微流控芯片技术 微流控芯片^[55] (microfluidic chip) 或称微全分析系统 (miniaturized total analysis system 或 micro total analysis system, μ -TAS),是将各基本操作单元(如细菌培养、分选、裂解,待测样品制备、反应、分离、检测与分析等)集成或基本集成到一块几厘米至微米尺度的芯片上,形成微通道网络,通过可控流体贯穿整个系统,用以取代常规生物或化学实验室的各种功能的一种技术。

齐明月等^[56]在 18 h 内,运用微流控芯片技术同时实现了对 3 种细菌的鉴定和 6 种抗生素敏感性测试。何佳芮^[57]利用微流控芯片技术构建了一个既能快速鉴定病原菌又可同时进行病原菌药敏分析的联合检测平台,并在 4~8 h 完成了肠出血性大肠埃希菌在 3 种不同抗生素、不同浓度作用下的药敏分析,证明了在该微流控芯片平台上可以同时进行病原菌检测和药敏分析,所得结果与大平台水平结果一致。Baltekin 等^[58]用微流控芯片来捕获临床分离菌群,对几种不同浓度的单菌生物反应进行显微镜观察,0.5 h 就能看到 9 种抗生素药物对细菌的药

物敏感性效果。Choi 等^[59]运用微流控结合显微镜观察追踪活性药物作用之后的单细菌的形态变化,放大药物作用机制,更有利于药效分析。该方法大幅度地缩短了检测时间,具备较好的灵敏度、特异性和可靠性。

运用微流控体系进行药敏试验之所以能较大程度减少检测时间是因为该体系有利于代谢产物的快速积累,无需长时间预培养^[60]。郑振等^[61]建立的液滴微流控芯片实现了药物与菌液孵育 2 h 即可对抗菌药物活性的快速分析,所测得的最小抑菌浓度值与微量液体稀释法的一致率达到 100%。证明该方法简便快速、药物消耗少、实验结果稳定,适用于大量抗菌药物的筛选。由于微流控技术具有传质传热速度快、反应产率高、操作安全和易于放大等独特的优势,徐亮亮^[62]利用微流控技术考察了含糖黄酮酯类衍生物的抗菌敏感性。

微流控芯片技术从开发至应用在各个领域里仅用了二十余年的时间,其发展与成果为药物抑菌的敏感性研究提供了新思路,实现了用较短时间在芯片上培养细菌,通过对单细胞形态和代谢物质的检测,进行药物敏感性实验的高通量分析。

目前基于微流控芯片技术在抑菌方面的研究尚处于起步阶段,且天然药物具有成分复杂等特殊性质,现少有实验运用该方法研究天然药物的抑菌敏感性,但若将天然药物与该技术的优势结合起来利用,定会有很可观的研究前景。综上分析,现阶段药物的体外抑菌敏感性实验方法分析见表 1。

表 1 药物体外抑菌敏感性实验方法的总结

Table 1 Summary of experimental methods for *in vitro* antimicrobial susceptibility of drugs

体外抑菌方法	组成	优点	缺点	适用范围
液体培养基法	比浊法、微量肉汤稀释法、营养物质消耗法	抑菌效果转移至吸光度和营养消耗量,结果更直观	溶解性较差及透光率较差的药物会对结果有较大影响	研究溶解性较好、透光率较好的药物抑菌活性机制;微量肉汤稀释法更适用于药物敏感性的初步筛选。适用药物包括黄芩、大黄等大多数中药活性成分
固体培养基法	扩散法、药敏板法、菌落计数法	操作方便、成本低、结果准确性高、重复性高、易发现污染菌株或耐药突变株	对于活性物质筛选的工作量较大;扩散法要求药物在琼脂中的扩散性较高	适用于有效成分较稳定、溶解性稍差的中药。适用药物包括中药汤剂、原料药材或挥发油类等活性成分
高通量筛选法	全自动药敏法、流式细胞术、微流控芯片技术	针对性强、快速、高通量	仪器耗材昂贵,成本高	适用于高通量单组分定量的抑菌活性测定。适用药物为大多数中药活性成分

2 体内抑菌实验

动物体内抑菌实验能较好的模拟人体内环境,实验结果能更直接表示其抑菌程度及对机体的实际

影响,结果更具有说服力,是临床应用前必不可少的一步。

2.1 临床治疗模拟法 崔一喆等^[63]在研究金银花

提取物对常见致病菌抑菌活性时,运用此类方法先连续 3 d 给小鼠灌注不同待测菌,再连续 4 d 灌注金银花水煎剂,以 7 d 内小鼠的死亡情况作为抑菌效果评价。徐成坤等^[64]用此类方法研究发现腹康颗粒对大肠埃希菌、乙型副伤寒杆菌、痢疾杆菌感染小鼠具有较好的抑制作用。

该实验方法是通过建立人工感染模型^[65-66]后的临床表现及检测指标来判断药物的抑菌活性和量效关系,这种方法类似临床上通过疾病诊断后给药治疗的过程,可以研究对于同一病症即同一感染程度下,不同药物的抑菌活性。该方法的缺点是不易建立完全统一的动物感染模型,由于不同机体免疫情况不同,可能导致同一染菌量不同致病效果的出现,说明规范的造模标准是保证实验效果的前提。

2.2 增强机体机能法 罗宇东等^[67]在研究常春卫矛提取物对金黄色葡萄球菌的体内抑菌作用时运用了该方法,将小鼠连续灌胃给药 14 d,腹腔注射金黄色葡萄球菌进行接种染菌,选择 4 d 内各组小鼠的死亡率作为判断药物对金黄色葡萄球菌的抑制作

用。任大鹏等^[68]采用体内抑菌方法研究发现,鼻窍通合剂对小鼠死亡有保护作用。辛颖等^[69]在研究玉簪花乙醇提取物对乙型溶血性链球菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性时,通过观察小鼠的死亡率来判断玉簪花乙醇提取物的体内抗菌敏感性,结果发现玉簪花乙醇提取物中含有抑菌的活性成分,为寻找新的抗菌药物提供了药理学参考依据。邱妍等^[70]运用该类方法先给小鼠连续 5 d 灌胃 8 种中药药液,第 5 天灌胃给药后 2 h,腹腔注射大肠埃希菌进行菌种感染,观察小鼠临床表现及死亡率,结果测得不同中药对大肠杆菌的体内抑菌敏感性作用。

此类方法是通过一段周期的给药,建立其较强的动物机体机能,再人为使动物感染待测菌,由临床表现反映抑菌效果。中药抑菌机制不仅有与抗生素类似的直接对病原菌产生抑制作用,还有通过调节机体免疫功能达到药效的作用。因此,此类方法能够较好地表达中药在抑菌效果上的优势,但是前期给药也存在药物被机体代谢的可能,进而有可能会影响结果的分析。见表 2。

表 2 药物体内抑菌敏感性实验方法的总结

Table 2 Summary of experimental methods for *in vivo* antimicrobial susceptibility of drugs

体内抑菌方法	优点	缺点	适用范围
临床治疗模拟法	可对比药物的临床感染治疗	感染模型不易统一标准	药物的药理作用考察
增强机体机能法	可说明中药在防御感染方面的优势	药物未直接作用于病证	天然药物的开发利用

3 体内外抑菌联合实验

该方法通过动物的含药血清与各待测菌种进行体外抑菌实验,以动物不同时段血清的检测结果来判断其对各类菌种的抑菌效果,得知其抑菌药效作用发挥最大的时段^[71]。毛跟年等^[72]采用纸片法和增强机体机能法分别进行了野艾蒿提取物对金黄色葡萄球菌的体内外抑菌活性研究,证明了药物的抑菌敏感性。赵佳文等^[73]运用体内外抑菌联合实验研究子芩对肺炎链球菌的抑菌敏感性。程强等^[74]研究了四季青水煎液的体外抑菌活性和对小鼠耳肿胀发炎的治疗效果,全面评价了药物的抑菌活性。该方法对于分析药物、机体和病原菌的关系更具针对性,药物与机体经过一段时间的作用,实现药物实际的代谢情况,此时机体的含药血清比体外抑菌实验中溶剂配制的药液能更进一步表达其真实药效。采用此含药血清对待测菌进行体外抑菌实验,结果更具有说服力。

4 讨论

综合以上分析发现,在考察不同天然药物的抑

菌敏感性时,天然药物抑菌试验方法的选择应遵循以下规则:若待测药物性质已知,则应当结合实验方法的抑菌原理、待测天然药物的自身特点以及发挥药效原理综合来选择方法。如白兰花、连翘、丁香、荆芥中的挥发油类抑菌有效成分的测定不宜选用纸片法,以防止有效成分丢失,影响药效作用,但可以采用药敏板法或菌落计数法,将有效物质固定在培养基内,稳定药效的发挥;培养后药液颜色加深严重的,如苦丁、杜仲等,不易用肉眼以及光学设备辨别抑菌敏感性的天然药物,可采用营养物质消耗法;多糖类抑菌敏感性药物,如麦冬、黄芪、玉簪、天麻、枸杞等,不宜用营养物质消耗法,且其药液较为黏稠,流动性差,亦不可选用扩散法,但可以选用药敏板法、比浊法、微量肉汤稀释法、菌落计数法等考察药物抑菌敏感性。若待测药物性质未知,可首先选择检测成本较低、检测速度较快的微量肉汤稀释法进行初步筛选,再使用固体培养基法对筛得的药物进行抑菌敏感性验证,最后运用微流控等高通量筛选

方法进行抑菌机制考察;在体外抑菌实验稳定性一致的前提下,进行体内以及体内外联合抑菌实验,研究天然药物在机体内的表达作用效果,从而完成一个较为完整的研究过程。

近年来,微流控芯片技术逐步走向成熟,采用这种新型药敏检测方法,可直观检测天然药物在细胞水平上的抑菌敏感性效果,帮助了解天然药物的药效机制,提示研究者开发天然药物在抑菌活性上的潜力与突破。随着此类精度更高、针对性更强的方法的应用和普及,也会促使其耗材成本较高的问题得到改善,将更利于天然药物抑菌敏感性的研究和发展。

为了更精准地研究天然药物对细菌和耐药菌的敏感性作用,研究者应当选用天然药物适宜的方法进行考察研究,或者改进、开发出更加适合考察中药抑菌敏感性实验的方法,避免由于抑菌方法自身的缺点以及天然药物的复杂性所带来的影响,以期未来建立起中药高通量抑菌检测方法,为中药在抑菌、抗耐药菌株方面发掘出更多的潜力和应用价值,为解决抗生素滥用所带来的各种耐药菌株的出现等问题做出有力解答。

[参考文献]

[1] 世界卫生组织. 2017 年世界卫生组织统计报告[R]. 日内瓦:世界卫生组织,2017.

[2] 崔煦然,赵京霞,郭玉红,等. 细菌耐药背景下中药抗菌作用研究进展[J]. 世界中医药,2016,11(10):1940-1944.

[3] 曲径,殷中琼,贾仁勇,等. 艾叶等 20 种中药对禽多杀性巴氏杆菌的体外抗菌活性[J]. 华中农业大学学报,2015,34(2):91-94.

[4] 杨露,谢晓芳,胡荣. 麻黄附子细辛汤联合抗生素的体外抗大肠埃希菌作用研究[J]. 中药与临床,2015,6(3):35-38.

[5] 于蓓蓓,吕凌,于宗渊,等. 基于抑菌药效的黄芩提取物精制工艺优选[J]. 中草药,2014,45(3):362-366.

[6] 郭时金,王艳萍,付石军,等. 碱性水素水对四种常见病原微生物的体外抑制试验[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(22):152-153,156.

[7] 蔡伟,马月,方杰,等. 中药材生物物质还原制备银纳米颗粒及其抑菌活性研究[J]. 中草药,2015,46(7):977-981.

[8] 苏秀玲,孙虹,高逊,等. 体外抑菌实验微量定量检测方法的建立与探索[J]. 中国药学杂志,1999,34(1):47-49.

[9] 潘珊珊,谢鲲鹏,谢明杰. 五倍子粗提物对 MRSA β -内

酰胺酶的抑制作用[J]. 中国生化药物杂志,2017,37(1):39-41.

[10] 黄宏,陈一强,孔晋亮,等. 不同中药单体成分对两性霉素 B 耐药的烟曲霉抑菌活性的体外研究[J]. 中国现代医药杂志,2014,16(2):1-4.

[11] Dzoyem J P, Kuete V, McGaw L J, et al. The 15-lipoxygenase inhibitory, antioxidant, antimycobacterial activity and cytotoxicity of fourteen ethnomedicinally used African spices and culinary herbs [J]. J Ethnopharmacol,2014,156:1-8.

[12] Guendouze-Boucheffa N, Madani K, Chibane M, et al. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria[J]. Ind Crop Prod,2015,70:459-466.

[13] 孙红祥. 一些中药及其挥发性成分抗霉菌活性研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(2):27-30.

[14] Baczek K B, Kosakowska O, Przybył J K, et al. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.) [J]. Ind Crop Prod,2017,102:154-163.

[15] Vieitez I, Maceiras L, Jachmaniún I, et al. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology[J]. J Supercrit Fluid,2018,133:58-64.

[16] 彭苑霞,刘晓强,温玲玲,等. 大黄等 5 味中药及单体成分对临床多重耐药菌的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):103-107.

[17] Vora J, Srivastava A, Modi H. Antibacterial and antioxidant strategies for acne treatment through plant extracts [J]. IMU, 2017, doi: 10.1016/j.imu.2017.10.005.

[18] WANG F, WEI F Y, SONG C X, et al. *Dodartia orientalis* L. essential oil exerts antibacterial activity by mechanisms of disrupting cell structure and resisting biofilm[J]. Ind Crop Prod,2017,109:358-366.

[19] Riesselman M H, Hazen K C, Cutler J E. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay[J]. J Clin Microbiol,2000,38(1):333-340.

[20] 马建凤,刘华钢,朱丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展[J]. 药物评价研究,2010,33(1):42-45.

[21] 张德显,陈耀楠,南汇珠,等. 10 种中药对鸡白痢沙门菌的体外抗菌活性测定[J]. 中国兽医杂志,2013,49(3):41-43.

[22] 王悦,董荟慧,李有,等. 13 味中药对鸡大肠杆菌的抑菌试验[J]. 中国兽医杂志,2013,49(11):43-45.

[23] 管翠萍,冯磊,乔霞,等. 不同中药提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用和逆转机制[J]. 中国

兽医学报,2015,35(12):1997-2001.

[24] Orbán-Gyapai O, Liktó-Busa E, Kúsz N, et al. Antibacterial screening of *Rumex* species native to the Carpathian Basin and bioactivity-guided isolation of compounds from *Rumex aquaticus*[J]. Fitoterapia,2017, 118:101-106.

[25] 胡旭光,戴王强,韩彬,等. 三种中药挥发油抑菌和抗疲劳作用实验研究[J]. 现代中西医结合杂志,2012, 21(8):816-817,820.

[26] 张国哲,苏昕. 132 味中药水提物对 8 种致病真菌抑菌活性的筛选[J]. 辽宁中医杂志,2012,39(9): 1834-1837.

[27] 李昕,赵月,苏昕. 32 味中药水提物对 4 种真菌抑菌实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(3): 36-39.

[28] 彭璐,张志杰,龚千锋,等. 基于成分分析及抗菌活性的百药煎炮制工艺研究[J]. 中草药,2016,47(21): 3805-3809.

[29] 魏萌,吴国江,郭永红,等. 14 种中草药对肠源性益生菌及出血性大肠杆菌的抑菌作用[J]. 河北农业大学学报,2013,36(2):108-111.

[30] 张文治,栗娜. 苍耳化学成分及生物活性研究[J]. 高师理科学刊,2016,36(12):30-32.

[31] 南苹瑶,王小莺. 14 种中药乙醇提取物对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 中兽医学杂志,2017(5):6-8.

[32] 王玉荣,邢韶芳,李钟洙,等. 囊荷提取物抗氧化能力及抑菌作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22 (24):59-63.

[33] 廖乐乐,吴丽霞,李敏,等. 加压提取对皂苷类成分体外抗氧化及抑菌活性的影响[J]. 中国民族民间医药,2015,24(23):20-21.

[34] Laghmouchi Y, Belmehdi O, Senhaji N S, et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Origanum compactum* Benth. essential oils from different areas at northern Morocco[J]. S Afr J Bot,2018,115:120-125.

[35] 罗萍,孙小燕,荆迎军,等. 东亚飞蝗甲壳素提取条件的优化及衍生物壳聚糖抑菌活性研究[J]. 天津中医药大学学报,2013,32(2):94-97.

[36] 甄淑芬,刘晓波,王博,等. 参柏洗液体外抑菌效力检测[J]. 中国处方药,2018,16(8):39-41.

[37] 黄依玲,冯洁,赖茂祥. 两面针叶抗菌活性部位研究[J]. 中国医药导报,2014,11(21):13-16.

[38] 李宏伟,刘艳萍,史钰. 挖沟法定性检测蝴蝶素的抑菌作用[J]. 锦州医学院学报,1995,16(4):66.

[39] 骆琦. 肉制品中产芽孢菌的分离鉴定及抑菌方法研究[D]. 天津:天津科技大学,2017.

[40] 张超,赛景影,张晓天,等. 一次性氧氟沙星滴眼液抑菌效力的检测及其结果评价[J]. 吉林大学学报:医学版,2014,40(1):113-116.

[41] 邓新焕,王亚静,于悦,等. 酚-黄复方对痤疮致病菌的体外抗菌作用研究[J]. 天津中医药大学学报,2014, 33(5):299-302.

[42] 郝佳,刘哲,张瑜,等. 苦参、绿茶及紫苏叶提取物联用对金黄色葡萄球菌的体外活性研究[J]. 天津中医药大学学报,2014,33(5):296-298.

[43] 吕雪梅,邱毅,董云玲,等. 桔梗五倍子提取液的抑菌实验研究[J]. 光明中医,2015,30(4):726-728.

[44] 董凤. 中药成分对多重耐药性幽门螺杆菌的体外抑菌作用[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2017,5 (15):78.

[45] 秦静英,李晓华,黄衍强,等. 中药提取物对敏感性和耐药性大肠杆菌的抑制作用[J]. 现代医药卫生, 2013,29(10):1477-1478.

[46] 王晓磊,余道军,侯晓丽. 中药蟾酥抗多重耐药鲍曼不动杆菌体外实验研究[J]. 中华中医药学刊,2016, 34(11):2801-2804.

[47] 曾祥吉,李东霞. 中药抑菌实验方法的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(4):518-520.

[48] 王偲. 肺炎链球菌的 MIC 药敏方法在全自动微生物系统的临床应用及评价[D]. 重庆:重庆医科大学,2009.

[49] HE L, SU J, MING M, et al. Flow cytometry: an efficient method for antigenicity measurement and particle characterization on an adjuvanted vaccine candidate H4-IC31 for tuberculosis [J]. J Immunol Methods, 2018, 452:39-45.

[50] 张学沛,朱盛山,刘静,等. 评价中药体外抑菌法的研究进展[J]. 药物评价研究,2014,37(2):188-192.

[51] Paparella A, Taccogna L, Aguzzi I, et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2008, 19(12):1174-1182.

[52] Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000,44(10):2752-2758.

[53] Green L J, Marder P, Mann L L, et al. LY303366 exhibits rapid and potent fungicidal activity in flow cytometric assays of yeast viability [J]. Antimicrob Agents Chemother,1999,43(4):830-835.

[54] Green L, Petersen B, Steimel L, et al. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry [J]. J Clin Microbiol,1994,32(4):1088-1091.

[55] 林炳承,秦建华. 微流控芯片实验室[J]. 色谱,2005, 23(5):456-463.

[56] 齐明月,杜燕,刘未平,等. 基于微流控芯片的尿路感染细菌鉴定及抗生素敏感性测试[J]. 分析化学, 2016,44(4) :610-616.

[57] 何佳芮. 基于集成型微流控芯片的细菌快速检测及药敏分析[D]. 大连:大连医科大学,2014.

[58] Baltekin Ö, Boucharin A, Tano E, et al. Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(34) :9170-9175.

[59] Choi J, Yoo J, Lee M, et al. A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(267) :267-274.

[60] 唐艳艳. 基于反射干涉光谱的微芯片传感器在微生物分析中的应用[D]. 杭州:浙江大学,2013.

[61] 郑振,陈阳,李武宏,等. 基于液滴微流控芯片技术的抗白念珠菌药物筛选研究[J]. 药学报, 2017, 52(12) :1884-1889.

[62] 徐亮亮. 基于微流控反应技术的酶促含糖黄酮类化合物区域选择性酯化及抑菌活性研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2017.

[63] 崔一喆,王秋菊,王新,等. 金银花提取物对常见致病菌的体内外抑菌活性测定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(5) :155-157.

[64] 徐成坤,阳波. 腹康颗粒对小鼠体内抑菌作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(6) :12-15.

[65] 王航,汤承,岳华,等. 小檗碱对小鼠体内抑菌作用的研究[J]. 西南民族大学学报:自然科学版, 2013, 39(5) :684-686.

[66] 陈思思,石心红. 2 种黄檀属植物粗提物的抑菌抗炎作用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12) :157-162.

[67] 罗宇东,张强,蒋林,等. 常春卫矛提取物体外及体内抑菌作用的试验研究[J]. 中国当代医药, 2014, 21(18) :9-11, 15.

[68] 任大鹏,朱竟赫,潘洪飞,等. 鼻窍通合剂体内外抑菌作用实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12) :2977-2980.

[69] 辛颖,白玉花. 蒙药玉簪花乙醇提取物体外和体内的抑菌活性研究[J]. 中成药, 2015, 37(3) :653-656.

[70] 邱妍,王志蕊,李雯静,等. 几种常见中药对大肠杆菌的体内外抑菌效果[J]. 畜牧兽医科技信息, 2012(10) :29-31.

[71] 陈绍辉,胥洪冰,赵海沅,等. 三子汤的体内抑菌作用试验[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(11) :63-64.

[72] 毛跟年,胡家欢,刘艺秀. 野艾蒿提取物对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11) :89-94.

[73] 赵佳文,李水清,刘艳菊,等. 基于抗菌活性及病理指标评价子芩与枯芩对肺炎的药效学差异[J]. 中草药, 2018, 49(17) :4064-4670.

[74] 程强,周杨杨,唐炯,等. 四季青水煎液体外抗内毒素、抗菌和体内抗炎作用[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(6) :765-771.

[责任编辑 刘德文]