

维生素 C 对幽门螺旋杆菌体外抑菌试验

田元春(广西中医学院第一附属医院药剂科, 南宁 530023)

摘要:目的: 考察维生素 C 对幽门螺旋杆菌的活性。方法: 采用试管两倍稀释法测定维生素 C 对幽门螺旋杆菌的体外抑菌效果。结果: 不同 pH 环境下, 维生素 C 对幽门螺旋杆菌有不同的抑制作用。pH 5.5 的抑制作用为 pH 7.4 的 16 倍; 且当维生素 C 的浓度 ≥ 8 倍 MIC 时具有杀菌作用。结论: 大剂量维生素 C 在体外可抑制幽门螺旋杆菌; 为用于临床治疗提供了一定的依据。

关键词: 维生素 C; 幽门螺旋杆菌; 体外抑菌

中图分类号: R977.2⁺3

文献标识号: B

文章编号: 1006-0111(2001)02-0080-02

幽门螺旋杆菌(HP)是慢性胃炎和消化性溃疡的重要病原菌,是引起胃癌的一个高危因素。流行病学资料表明,饮食中摄入高含量的维生素 C 可降低胃癌的发生率,已证实维生素 C 可消除 HP 产生的自由基,但维生素 C 对 HP 的直接作用不明。本实验采用试管两倍稀释法对维生素 C 进行 HP 体外的最低抑菌浓度(MIC)进行测定。

1 培养基

1.1 布氏肉汤 按新编细菌检验用培养基手册配制^[1]制成 pH=7.4(A组)、pH=6.0(B组)、pH=5.5(C组)3组培养基。

1.2 Skirrow 培养基 灭菌后加入 TMP 磺胺增效剂抗菌混合液(0.5%) 摇匀后倒入双碟备用。TMP 抗菌混合液: TMP5mg, 万古霉素 10mg, 多粘菌素 B250 μ 和头孢霉素 15mg。

2 幽门螺旋杆菌菌种分离培养

2.1 取胃粘膜组织 均匀涂抹于上述备妥的 Skirrow 双碟上,置 37 $^{\circ}$ C 微氧环境(使用德国 bio meerieux generbox 加入催化剂,使成微氧环境 5%~8% CO₂, 5%~8% O₂, 33.6% H₂)。孵育 48h 后观察菌落形态、特征、染色、生化反应,并同时作快速尿素酶试验^[2]。以上胃粘膜组织由南宁市第一人民医院胃镜室提供。

2.2 菌液制备 将上述分离并经鉴定的幽门螺旋杆菌以布氏肉汤增菌 48h 后用 10% 葡萄糖液稀释至 10⁻⁵(每毫升约含 1000 个菌)。

3 药液制备

精密称取维生素 C 晶体 13.1072g, 焦亚硫酸钠 0.4g, 碳酸氢钠 6.04g。在烧杯中加入约 80ml 蒸馏水,通二氧化碳饱和,加抗坏血酸溶解后,小心分次加入碳酸氢钠,以免作用过猛,使液体溅出,待液面不再发生二氧化碳气泡时,加焦亚硫酸钠溶解,移至

100ml 容量瓶中,再添加用二氧化碳饱和的蒸馏水至刻度,测定 pH 为 6.5~7.0。密闭容量瓶,置 100 $^{\circ}$ C 流通蒸气灭菌 15min,即得浓度 131.072mg/ml 的供试液。

4 方法

采用试管两倍稀释法^[3]: 每组取无菌试管 13 支,每支加入布氏肉汤 1ml,第 1 支管加入上述供试液 1.0ml,混合后吸取 1.0ml 加入第 2 管中,同法稀释至第 12 管,从第 12 管中取出 1.0ml 于一灭菌空试管作空白对照。各管加菌液 10⁻⁴0.1ml(约 1000 个菌),混匀,置 37 $^{\circ}$ C 微氧环境培养 48h 后观察结果。液体混浊表明有菌生长;液体澄清,摇匀后仍澄清者,无菌生长。无菌生长的最低药物浓度为最低抑菌浓度(MIC)。阴性对照:加药不加菌液,应澄清。阳性对照:不加药加菌液,应浑浊。空白对照:不加药不加菌液,应澄清。依次将未见细菌生长的各管取 1ml,加入双碟后注入 Skirrow 培养基,摇匀,置 37 $^{\circ}$ C 微氧培养 72h,观察是否有菌生长,平板上的菌落数小于 5 个的最小稀释度的药物浓度为最低杀菌浓度(MBC)。

5 结果(见表 1)

6 讨论

6.1 供试液配制中,加入抗氧化剂焦亚硫酸钠以防止抗坏血酸的氧化失效,以碳酸氢钠调节 pH 为 5.5~6.0,此时溶液较稳定。

6.2 在 pH7.4 的培养基中,维生素 C 的 MIC 为 2048 μ g/ml,而在 pH 值为 6.0 和 5.5 的培养基中的 MIC 分别为 512 和 128 μ g/ml,其抑菌活性较在 pH7.4 培养基中分别提高 4 倍和 16 倍,这表明维生素 C 对幽门螺旋杆菌有抑制作用,并且此种抑制作用依赖于培养基的 pH 值。

(下转第 82 页)

放大测量法分别测量致炎前及致炎后 3、6、12、24h 足容积,与致炎前比较,计算各组致炎后不同时间的肿胀率。于致炎后 72h 处死大鼠,将两足自踝关节

处剪下称重与正常足比较,计算各组的肿胀率,经 t 检验,结果见表 2。

表 2 消炎片对大鼠角叉菜胶性足跖炎症的影响($\bar{x} \pm SD$, $n = 10$)

组别	3		6		12		24(h)	
	左	右	左	右	左	右	左	右
生理盐水组	0.76 ± 0.07	0.55 ± 0.09	0.52 ± 0.08	0.59 ± 0.05	1.04 ± 0.08	1.12 ± 0.08	1.10 ± 0.07	0.99 ± 0.08
	0.70 ± 0.06	0.58 ± 0.07	0.47 ± 0.06	0.63 ± 0.05	1.02 ± 0.08	0.99 ± 0.11 ^c	0.88 ± 0.09 ^c	0.85 ± 0.08 ^a
双黄连口服液	0.73 ± 0.06	0.52 ± 0.03 ^a	0.53 ± 0.04	0.59 ± 0.07	0.96 ± 0.10 ^c	0.89 ± 0.07	0.88 ± 0.08 ^b	0.88 ± 0.09 ^c

注:与生理盐水组比较:^a $P < 0.01$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.5$;与双黄连组比较:^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.5$

实验结果表明:0.5g/片、0.32g/片消炎片均具有抗炎作用,但 0.32g/片消炎片的抗炎作用弱于 0.5g/片消炎片。

2.3 消炎片的抑菌实验

以注射用水为溶媒,将 0.5g/片消炎片制成

100g/dl、50g/dl、25g/dl 3 种浓度液体,选 25ml/平板琼脂板,菌液稀释至 1.5 亿/ml,采用平板打孔法,以双黄连口服液为对照品,其用量与上述 3 种液体相当。经 X^2 检验,其抑菌效果见表 3。

表 3 消炎片的抑菌效果($n = 5$)

菌种	培养基	药 物			对 照
		100g/dl	50g/dl	25g/dl	
金黄色葡萄球菌	血琼脂板	11 ± 0.04 ^c	8 ± 0.09 ^c	6 ± 0.05 ^c	10 ± 0.34
乙型溶血性链球菌	血琼脂板	7 ± 0.11 ^c	5 ± 0.05 ^c	3 ± 0.17 ^c	6 ± 0.11
肺炎双球菌	血琼脂板	8 ± 0.12 ^c	5 ± 0.29 ^c	4 ± 0.45 ^c	7 ± 0.14
流感嗜血杆菌	巧克力琼脂板	7 ± 0.31 ^c	5 ± 0.06 ^c	6 ± 0.12 ^c	7 ± 0.11
大肠杆菌	普通琼脂	4 ± 0.78	2 ± 0.021		

^c $P > 0.05$

结果表明:消炎片 0.5g/片的抑菌作用与双黄连口服液的抑菌效果相当。

3 结果

研究结果表明:消炎片 0.5g/片的抑制消炎作用与双黄连口服液相当。此种片剂克服了双黄连口

服液口感苦的缺点,且具有服药次数少、携带方便、不易变质的优点,值得推广应用。

参考文献:

- [1] 陈崇尚,何德庆,高其铭,等. 痛得安胶囊镇痛抗炎作用研究[J]. 人民军医药学专刊,1997,13(3):132 收稿日期:2000-09-05

(上接第 80 页)

表 1 不同 pH 维生素 C 抑菌结果

浓度 (μg/ml)	A 组(pH=7.4)		B 组(pH=6.0)		C 组(pH=5.5)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
131 072	-	-	-	-	-	-
65 536	-	-	-	-	-	-
32 768	-	-	-	-	-	-
16 384	-	-	-	-	-	-
8 192	-	12 个菌	-	-	-	-
4 096	-	+	-	-	-	-
2 048	-	+	-	8 个菌	-	-
1 024	+	+	-	+	-	10 个菌
512	+	+	-	+	-	+
256	+	+	+	+	-	+
128	+	+	+	+	-	+
64	+	+	+	+	+	+
阴性对照	-	-	-	-	-	+
阳性对照	+	1000 个菌	+	1 000 个菌	+	1 000 个菌
空白对照	-	-	-	-	-	-

注: + 试验管长菌 - 试验管未长菌

6.3 当浓度 ≥ 8 倍 MIC 时,维生素 C 具有杀菌作用。

6.4 实验表明,大剂量维生素 C 在体外可抑制 HP 的生长,为将来用维生素 C 治疗幽门螺旋杆菌感染的进一步研究提供了依据,此外,亦为临床治疗提供了新思路。

参考文献:

- [1] 杜平华,吕文和. 新编细菌检验用培养基手册[M]. 青岛:海洋大学出版社,1994 106.
[2] 李影林. 临床微生物学及检验[M]. 北京:人民卫生出版社,1995. 338~ 339.
[3] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京:科学出版社,2000. 198~ 199.

收稿日期:2000-08-08