·中药研究·

基于 UHPLC－QE－MS 探究清热解毒汤对肉芽肿性乳腺炎主要致病菌克氏棒状杆菌的体外抑制作用及主要抑菌成分*

曾奕斐[1,2]，王梦洁[1,2]，李积锋[1,2]，高翔[1]，付娜[1]，郭鱼波[1]，周玉[1]，张董晓[1]

1. 首都医科大学附属北京中医医院，北京 100010；2. 北京中医药大学，北京 100029

摘要：目的：基于超高效液相色谱－高分辨质谱联用（ultra－high performance liquid chromatography－Q exactive－mass spectrometry，UHPLC－QE－MS）技术，深入探究清热解毒汤对克氏棒状杆菌（corynebacterium kroppenstedtii，CK）的体外抑制作用及主要抑菌成分。方法：选取 2023 年 2 月至 2024 年 2 月临床穿刺标本经质谱鉴定为 CK 感染的肉芽肿性乳腺炎（granulomatous mastiti，GM）患者的 CK 分离菌株。通过微量稀释法及 E－Test 实验，检测清热解毒汤及其单味中药，以及 3 种抗生素对分离株抑制作用的最低抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）值，评价药物体外抑菌作用。采用 UHPLC－QE－MS 检测清热解毒汤主要活性成分，并检测各化合物及其联合抗生素应用的抑菌能力，探究化合物对于临床抗生素耐药菌株的作用效果，进一步探究清热解毒汤主要活性抑菌成分及其抑菌效能。结果：清热解毒汤对临床 CK 分离株的体外抑制作用良好，其中发挥主要抑菌作用的单味中药为连翘、黄芩。在鉴定出的 67 个化合物中，通过文献筛选出 6 种可能发挥抗菌作用的化合物，其中黄芩素、黄芩苷、连翘酯苷 A 对 CK 分离株的抑制作用较为优异，黄芩素最为显著。中药联合临床常见抗生素应用时大多可发挥明显协同作用。此外，对于临床抗生素耐药分离株，黄芩素仍能发挥稳定的体外抑菌作用。结论：清热解毒汤及其有效化合物黄芩素、黄芩苷、连翘酯苷 A 对 GM 患者 CK 分离株体外抑菌作用显著，抗菌效能稳定，为 GM 患者临床抗菌药物的选择及开发提供了新的思路及参考依据。

关键词：清热解毒汤；肉芽肿性乳腺炎；克氏棒状杆菌；抑菌作用；抑菌成分

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.11.385

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)11－2458－09

Inhibitory In Vitro Effect and Major Bacterial Inhibitory Components of Qingre Jiedu Decoction on GM Main Causative Organism CK Based on UHPLC－QE－MS

ZENG Yifei[1,2]，WANG Mengjie[1,2]，LI Jifeng[1,2]，GAO Xiang[1]，
FU Na[1]，GUO Yubo[1]，ZHOU Yu[1]，ZHANG Dongxiao[1]

1. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine，Capital Medical University，Beijing China 100010；
2. Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100029

Abstract：Objective：Based on ultra－high performance liquid chromatography－Q exactive－mass spectrometry（UHPLC－QE－MS）technique，to deeply investigate the in vitro inhibitory effect and main inhibitory components of Qingre Jiedu Decoction on Corynebacterium kroppenstedtii（CK）in vitro and the main inhibitory components. Methods：CK isolates from patients with granulomatous mastitis（GM）identified as CK－infected by mass spectrometry in clinical puncture specimens from February 2023 to February 2024 were selected. The minimum inhibitory concentration（MIC）values of Qingre Jiedu Decoction，its single herbal medicines，and three antibiotics

* **基金项目**：国家中医药管理局中医药古籍文献和特色技术传承专项项目（0686－2211CA08020Z）；国家中医药管理局青年岐黄学者培养项目（2022 年）；北京市中医药科技发展资金项目（BJZYQN－2023－08）

for their inhibitory effects on the isolates were detected by the microdilution method and the E – Test assay to evaluate the in vitro bacterial inhibitory effects of the drugs. UHPLC – QE – MS was used to detect the main active ingredients of Qingre Jiedu Decoction, and the bacteriostatic ability of the compounds and their combination of antibiotics was examined to investigate the effects of the compounds on clinical antibiotic – resistant strains, and to further investigate the main active antibacterial ingredients of Qingre Jiedu Decoction and their bacteriostatic efficacy. Results: The in vitro inhibition of clinical CK isolates by Clearing Heat and Eliminating Toxin Soup was good, in which the single herbs that exerted the main inhibitory effects were Lianqiao (Forsythia) and Huangqin (Scutellaria baicalensis). Among the 67 compounds identified, 6 compounds with possible antibacterial effects were screened through the literature, among which baicalein, baicalein, and forsythia glycoside A showed excellent inhibitory effects on CK isolates, with baicalein being the most significant. And most of them could exert obvious synergistic effects when combined with common clinical antibiotics. In addition, baicalein could still exert stable in vitro bacteriostatic effects on clinical antibiotic – resistant isolates. Conclusion: Qingre Jiedu Decoction and its active ingredients baicalein, baicalin, and forsythoside A can exert significant in vitro antibacterial effects on CK isolates from GM patients with stable antibacterial efficacy, which provides a new way of thinking and a reference basis for the selection and development of antimicrobial drugs for GM patients.

Key words: Qingre Jiedu Decoction; Granulomatous mastitis (GM); Corynebacterium kirschneri (CK); bacteriostatic effect; bacteriostatic ingredient

肉芽肿性乳腺炎(granulomatous mastitis, GM),又称为肉芽肿性小叶性乳腺炎,是一种以肉芽肿为主要病理特征的乳腺慢性化脓性炎症性疾病。近年来,发病率持续升高,本病病情缠绵复杂,易复发,极大程度地影响患者身心健康[1]。然而目前 GM 的发病诱因及机制尚未明确,限制了其临床治疗方案的制定及疗效。

随着检测技术的发展及微生物培养方法的改进,越来越多的研究均已证实细菌感染尤其是克氏棒状杆菌(corynebacterium kroppenstedtii, CK)在 GM 发病中的重要作用。既往文献报道中,诸多学者采用 16s rRNA 测序、qPCR、Sanger 测序等方法,证实 GM 患者的临床标本中能够鉴定出棒状杆菌的存在[2-4]。然而在临床抗菌治疗中,由于 CK 生长条件苛刻,检出率较低,缺乏药物敏感性实验及明确的用药指征,导致抗生素的临床有效率十分有限。

相较而言,中医药治疗 GM 具有明显优势,在业界也获得了广泛共识[5-6]。其中,清热解毒汤自成为首都医科大学附属北京中医医院院内协定处方以来,临床治疗 GM 已 20 余年,具有清热泻火、凉血解毒之功,临床疗效明确[7-8]。然而,目前尚无相关的实验室药物敏感性检测,导致清热解毒汤治疗 CK 感染相关的 GM 患者缺乏一定的证据支持。因此,本研究依照临床微生物实验室抗菌药物敏感性检测规范,基于超高效液相色谱 – 高分辨质谱联用(ultra – high performance liquid chromatography – Q exactive – mass spectrometry, UHPLC – QE – MS)技术,深入挖掘清热解毒汤体外抑制 CK 菌株的主要活性成分,并探究其与抗生素联合应用的效应关系,评价清热解毒汤在抗菌治疗中对 GM 的应用价值,为临床提供可靠的证据支持。

1　材料

1.1　药物与试剂　中药:清热解毒汤(组成:生知母 10 g,蒲公英 30 g,荆芥穗 10 g,连翘 15 g,黄芩 10 g,赤芍 15 g,板蓝根 15 g,牡丹皮 10 g,白茅根 30 g,生石膏 30 g),购自首都医科大学附属北京中医医院中药房。采用传统中药水煎法,将中药浓缩至生药浓度 2 g·mL^{-1},经微孔滤膜过滤除菌,4 ℃冰箱保存备用。单味中药制备同上。

抗生素:头孢曲松(ceftriaxone, CRO)、莫西沙星(moxifloxacin, MXF)、万古霉素(vancomycin, VAN)E – Test 药敏试纸条(意大利 Lionfllchem 公司,批号分别为:070822014;052323008;111022008)。

中药化合物:黄芩苷、黄芩素、连翘酯苷 A、连翘苷、槲皮素、木犀草素(源叶公司,批号分别为:N15GB167969; C06M11Y112641; A08IB212231; N05GB166572; O29HB199514; S08GB160295)。称取适量化合物按说明书溶解于二甲基亚砜,并适度稀释,化合物溶液现用现配。

M – H 阳离子调节肉汤(索莱宝公司,批号:A526R031);吐温 – 80(美国 Bioruler 公司,批号:r300812),二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(SIGMA 公司,批号:RNBK4887)等。

1.2　仪器与设备　质谱仪:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI – TOF MS,珠海美华公司);比浊仪(DensiCHEK Plus,法国 bioMerieux 公司)等。

1.3　菌株来源　病例来源：选取 2023 年 2 月至 2024 年 2 月于首都医科大学附属北京中医医院乳腺外科门诊就诊，经穿刺组织学病理明确诊断为肉芽肿性乳腺炎的女性患者。由乳腺外科医师对患者进行乳房肿物穿刺，使用灭菌拭子采集乳腺脓液标本，送检细菌培养。

菌株分离：将采集标本在哥伦比亚血平板上以分区划线方式进行接种，置于 35 ℃、5% CO_2 培养 48 h 后，可见簇状及散在分布的灰白色微小菌落。挑取单个菌落采用 MALDI－TOF MS 进行质谱鉴定，最终将鉴定结果匹配为 CK 的临床分离株纳入研究，传代培养后于－80 ℃冰箱冻存备用。

2　方法

2.1　菌株复苏　将冻存的菌株从－80 ℃冰箱中取出，复苏、转种于血琼脂平板上，置于 35 ℃，5% CO_2 培养箱中培养 48 h，待菌落生长稳定后传代至新的血琼脂平板，置于 35 ℃培养箱中培养 48 h，用于后续药物敏感性实验。

2.2　微量稀释法检测清热解毒汤及其单味中药体外抑制 CK 的最低抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）值　采用美国临床实验室标准化协会（clinical and laboratory standards institute，CLSI）推荐的 M－H 标准肉汤培养基，按说明配制后高压灭菌，冷却后分装备用。采用微量稀释法测定清热解毒汤及其单味中药体外抑制 CK 分离株的 MIC 值。将制备好的肉汤依次加入 96 孔板中，每孔 50 μL。然后，将倍比稀释后不同浓度的药物溶液分别加入其中，每孔 50 μL；另设置阳性对照（仅细菌及肉汤），以及阴性对照（仅肉汤）。用无菌接种环挑取处于对数生长期的菌落，按上述方法配置为菌悬液。倍比稀释后进行菌落计数，以确定 96 孔板内接种菌量在目标范围内。然后，将 10 μL 5×10^6 CFU·mL^{-1} 的菌悬液依次加入 96 孔板各孔中，每孔含菌量约为 5×10^4 CFU。将孔板置于相同条件的孵箱中培养 18～24 h 后，取出观察，以完全无菌生长孔的药物浓度为该药体外抗菌的 MIC 值。

2.3　UHPLC－QE－MS 法检测清热解毒汤有效活性成分

2.3.1　样品处理　称取清热解毒汤样品，加入 10 倍量蒸馏水，浸泡 30 min，武火煮沸后文火煎煮 30 min，过滤，滤渣加 8 倍量水，武火煮沸后文火煎煮 30 min，过滤，合并两次滤液。取滤液 2 mL，离心（12 000 r·min^{-1}）5 min，取上清液，－80 ℃保存待测。

2.3.2　UHPLC－QE－MS 检测清热解毒汤有效活性成分　采用 UPLC－Q－TOF/MS 法对清热解毒汤样品进行分析，根据样品多级质谱信息，结合天然产物高分辨质谱数据库及相关文献，对样品中化学成分进行分析。

色谱条件：色谱柱：Waters ACQUITY UPLC HSS T3（2.1 mm×150.0 mm，1.8 μm），柱温：30 ℃，流速：0.3 mL·min^{-1}，进样量：2 μL，检测波长：254 nm，190～400 nm，流动相比例：A 相乙腈，B 相 0.1% 甲酸水溶液，流动相梯度见表 1。质谱检测模式：ESI－Negative/Positive ion mode（由上海诗丹德公司完成检测），质谱参数见表 2。

表 1　流动相梯度

时间（t/min）	A%	B%
0—3	3	97
3—8	3～12	97～88
8—20	12～20	88～80
20—30	20～30	80～70
30—35	30～60	70～40
35—40	60～95	40～5
40—43	95	5
43.0—43.1	95～3	5～97
43.1—46.0	3	97

表 2　质谱参数

项目	参数	项目	参数
质量范围	50～1 700	二级质量范围	50～1 250
喷雾气压力	50	去簇电压（P/V）	100
辅助加热气压力	50	碰撞电压（P/eV）	±40
气帘气压力	35	碰撞电压摆幅（P/eV）	20
离子化电压（P/V）	－4 500/5 000	离子释放延迟（t/ms）	30
离子源温度（t/℃）	500	离子束宽度（t/ms）	15
去簇电压（P/V）	100	碰撞电压（P/eV）	10

2.4　微量稀释法检测清热解毒汤主要成分体外抑制 CK 的 MIC 值　根据 UHPLC－QE－MS 检测结果，并查阅相关文献报道，选择清热解毒汤有效活性入血成分中 6 种可能的活性抑菌化合物，采用微量稀释法测定其体外抑制分离株的 MIC 值。具体步骤同 2.2 项。

2.5　抗生素 E－test 药敏检测　菌悬液制备同上。按照 CLSI 推荐的标准药敏实验方法操作，用棉签蘸取适量菌悬液，均匀涂布于血琼脂平板上。将试纸条小心垂直放置于血琼脂平板上。放置后，将血琼脂平板置于 35 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 18～24 h。取出血琼脂平板，观察并进行结果判读。记录抑菌圈与试纸条切迹所对应的浓度，即为该药物的 MIC

值。实验结果采用欧洲药敏试验委员会(European committee on susceptibility testing, EUCAST)标准进行药物敏感性判读。

2.6　棋盘法检测抗生素联合清热解毒汤主要成分的体外抑菌作用　根据棋盘法实验设计,采用微量稀释法测定不同浓度组合的抗生素和各活性化合物溶液对临床分离菌株的联合抑菌作用。采用二倍稀释法,将以上各抗生素和天然化合物溶液的系列浓度药液两两组合干预各分离株。96 孔板每孔依次加入 50 μL 天然化合物溶液和 50 μL 抗生素溶液,再加入 100 μL MH 肉汤稀释的菌液,使各孔内菌量均为 5×10^4 CFU。每个联合药液浓度均设置 3 个平行孔。另设倍比稀释浓度的单体、抗生素溶液的单药孔、仅含空白肉汤的阳性对照孔和阴性对照孔,进行平行对照。35 ℃培养 18 ~ 24 h,观察并记录各孔有无细菌生长。计算分级抑制浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)以判定联合效应:FICI = [MIC(A 联合)/MIC(A 单用)] + [MIC(B 联合)/MIC(B 单用)]。参考文献[9]判读标准:采用 FICI 中位值判定,结果判断 FICI≤0.75 为协同作用。

2.7　清热解毒汤主要抑菌成分黄芩素对 CRO 耐药菌株的时间杀菌曲线　为探究清热解毒汤主要抑菌成分黄芩素对抗生素耐药菌株的体外抑制作用,选择临床 CRO 敏感菌株及耐药菌株,制备不同含药浓度的细菌悬液(黄芩素组、黄芩素联合抗生素、抗生素组),另设空白对照组(仅细菌 + 肉汤)作为生长对照,在 37 ℃下振荡培养。分别在 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 将细菌悬液取出进行 10 倍稀释,选择适当浓度接种于血琼脂平板上,在 37 ℃下孵育 24 ~ 48 h,选择 30 ~ 300 个菌落数的平板进行计数,并绘制时间杀菌曲线。

2.8　统计学方法　使用 SPSS 27.0 软件对数据进行统计分析。计数资料使用例(百分比)[n(%)]表示,组间比较使用 χ^2 检验。计量资料使用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,正态分布的组间比较使用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

共纳入 31 例穿刺脓液样本的细菌培养阳性,并经 MALDI - TOF MS 质谱鉴定为 CK 感染的女性乳腺炎患者,均经穿刺组织学病理明确诊断为肉芽肿性乳腺炎,年龄为 26 ~ 41 岁。

3.1　微量稀释法检测清热解毒汤及单味中药体外抑制 CK 的 MIC 值　结果显示,清热解毒汤复方对 GM 患者 CK 分离株的体外抑制作用 MIC 值为(78.13 ± 31.89) g · L^{-1}。单味中药的检测中,连翘、黄芩体外抗菌作用较为优异,提示复方对 CK 的抑菌作用可能主要来源于以上两药;其次为牡丹皮、赤芍、荆芥、蒲公英;知母、板蓝根、白茅根体外作用于 CK 分离株亦存在一定的抑菌性,但相对抑菌作用较小;此外,石膏对各分离株均无明显抑制作用(MIC≥500 g · L^{-1}),见表 3。

表 3　清热解毒汤及单味中药对 CK 的体外抑制作用　($\bar{x}\pm s$, g · L^{-1})

中药	MIC	中药	MIC
清热解毒汤	78.13 ± 31.89	赤芍	7.81 ± 0.00
黄芩	2.54 ± 2.02	牡丹皮	5.86 ± 3.80
连翘	1.63 ± 0.49	知母	125.00 ± 0.00
蒲公英	14.06 ± 3.29	板蓝根	156.25 ± 4.33
荆芥	10.94 ± 4.03	白茅根	312.50 ± 2.65

3.2　UHPLC - QE - MS 法检测清热解毒汤有效活性成分　采用 UHPLC - QE - MS 技术对清热解毒汤样品进行分析,应用 Analyst TF 1.7.1 软件采集数据,Peakview 1.2 软件进行数据处理。鉴定时优先将质谱数据与 Natural Products HR - MS/MS Spectral Library 1.0 数据库进行匹配,根据各色谱峰得分信息对化合物进行初步筛选,进一步根据各色谱峰一级、二级信息等,对化合物进行确认(见图 1、图 2)。

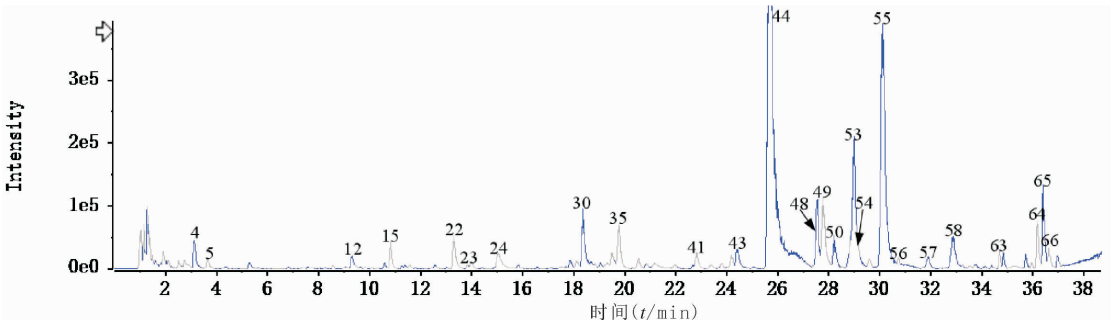


图 1　清热解毒汤 UPLC - HRMS 基峰离子流图(BPC) - 负离子模式

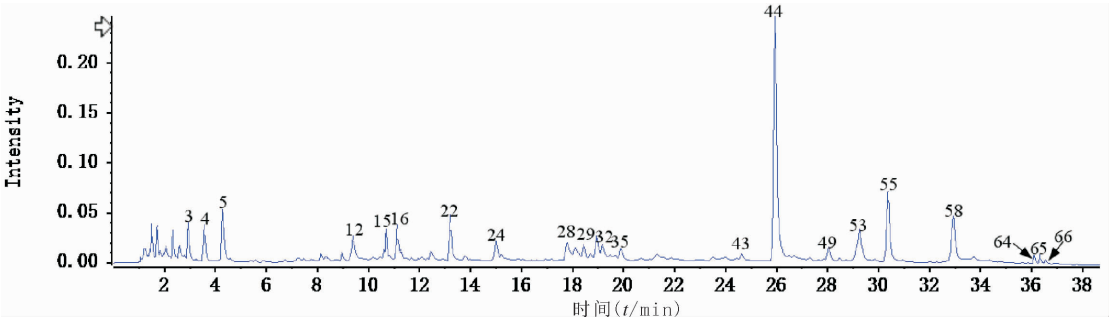


图 2　清热解毒汤 UPLC – HRMS 基峰离子流图(BPC) – 正离子模式

根据样品多级质谱信息,结合天然产物高分辨质谱数据库及相关文献,共鉴定出 67 个化合物(见表 4)。其中,共 16 种(23.88%)化合物来源于黄芩,为鉴定化合物最多的单味中药,表明黄芩在清热解毒汤主要活性成分中占据重要地位。

表 4　UPLC – Q – TOF – MS 技术检测清热解毒汤活性成分(部分)

序号	时间(t/min)	加合离子	m/z 实际值	m/z 理论值	ppm	分子式	分子量	中文名	英文名	来源
1	1.91	$[M-H]^-$	388.039 1	388.037 2	4.9	$C_{11}H_{19}NO_{10}S_2$	389.05	原告依春	Progoitrin	板蓝根
2	2.10	$[M-H]^-$	388.039 0	388.037 2	4.6	$C_{11}H_{19}NO_{10}S_2$	389.05	表原告依春	Epiprogoitrin	板蓝根
3	2.41	$[M-H]^-$	243.062 9	243.061 7	4.9	$C_9H_{12}N_2O_6$	244.07	尿苷	Uridine	板蓝根
4	3.12	$[M+H]^+$	268.104 3	268.104 6	-1.1	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.10	腺苷	Adenosine	板蓝根/蒲公英
5	3.65	$[M+H]^+$	284.099 8	284.099 5	1.1	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283.09	鸟苷	Guanosine	板蓝根/蒲公英
6	4.36	$[M-H]^-$	169.015 0	169.014 2	4.7	$C_7H_6O_5$	170.02	没食子酸	Gallic acid	赤芍/牡丹皮
7	7.55	$[M-H]^-$	197.046 7	197.045 5	6.1	$C_9H_{10}O_5$	198.05	丹参素	Danshensu	荆芥
8	9.44	$[M-H]^-$	353.089 1	353.087 8	3.7	$C_{16}H_{18}O_9$	354.10	新绿原酸	Neochlorogenic acid	蒲公英/荆芥/白茅根
9	10.03	$[M-H]^-$	461.169 6	461.166 4	6.9	$C_{20}H_{30}O_{12}$	462.17	连翘酯苷 E	Forsythoside E	连翘
10	10.41	$[M-H]^-$	477.067 5	477.067 5	0.0	$C_{21}H_{18}O_{13}$	478.07	槲皮素	Quercetin	连翘
11	11.35	$[M-H]^-$	353.090 4	353.087 8	7.4	$C_{16}H_{18}O_9$	354.10	绿原酸	Chlorogenic acid	蒲公英/荆芥/白茅根
12	11.51	$[M-H]^-$	289.072 1	289.071 8	1.0	$C_{15}H_{14}O_6$	290.08	儿茶素	Catechin	赤芍/牡丹皮
13	12.52	$[M-H]^-$	179.036 2	179.035	6.7	$C_9H_8O_4$	180.04	咖啡酸	Caffeic acid	蒲公英/荆芥
14	13.28	$[M-H]^-$	421.080 3	421.077 6	6.4	$C_{19}H_{18}O_{11}$	422.08	芒果苷	Mangiferin	知母
15	15.07	$[M+FA-H]^-$	525.164 2	525.161 4	5.3	$C_{23}H_{28}O_{11}$	480.16	芍药苷	Paeoniflorin	赤芍/牡丹皮
16	17.82	$[M-H]^-$	623.201 9	623.198 1	6.1	$C_{29}H_{36}O_{15}$	624.21	异连翘酯苷	Isoforsythiaside	连翘
17	17.89	$[M-H]^-$	473.075 7	473.072 5	6.8	$C_{22}H_{18}O_{12}$	474.08	菊苣酸	Chicoric acid	蒲公英
18	18.77	$[M-H]^-$	609.150 0	609.146 1	6.4	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.15	芦丁	Rutin	连翘
19	19.78	$[M-H]^-$	447.095 5	447.093 3	4.9	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.10	木樨草苷	Luteoloside	荆芥
20	20.13	$[M-H]^-$	623.201 4	623.198 1	5.3	$C_{29}H_{36}O_{15}$	624.21	连翘酯苷 A	Forsythoside A	连翘
21	23.08	$[M-H]^-$	609.186 3	609.182 5	6.2	$C_{28}H_{34}O_{15}$	610.19	橙皮苷	Hesperidin	荆芥
22	24.72	$[M-H]^-$	461.075 3	461.072 5	6.1	$C_{21}H_{18}O_{12}$	462.08	野黄芩苷	Scutellarin	黄芩
23	26.03	$[M-H]^-$	445.077 3	445.077 1	0.4	$C_{21}H_{18}O_{11}$	446.08	黄芩苷	Baicalin	黄芩
24	27.4	$[M+FA-H]^-$	579.212 4	579.208 3	7.1	$C_{27}H_{34}O_{11}$	534.21	连翘苷	Phillyrin	连翘
25	27.87	$[M+FA-H]^-$	965.502 1	965.496 3	6.0	$C_{45}H_{76}O_{19}$	920.50	知母皂苷 BII	Timosaponin BII	知母
26	29.25	$[M-H]^-$	285.041 1	285.040 5	2.1	$C_{15}H_{10}O_6$	286.05	木樨草素	Luteolin	荆芥
27	32.86	$[M+H]^+$	167.071 0	167.070 3	4.2	$C_9H_{10}O_3$	166.06	丹皮酚	Paeonol	牡丹皮
28	33.26	$[M+FA-H]^-$	947.495 1	947.485 7	9.9	$C_{45}H_{74}O_{18}$	902.49	知母皂苷 C	Timosaponin C	知母
29	33.82	$[M-H]^-$	269.046 4	269.045 5	3.3	$C_{15}H_{10}O_5$	270.05	黄芩素	Baicalein	黄芩
30	36.17	$[M-H]^-$	283.062 3	283.061 2	3.9	$C_{16}H_{12}O_5$	284.07	汉黄芩素	Wogonin	黄芩

3.3　微量稀释法检测清热解毒汤主要成分体外抑制 CK 的 MIC 值　结合 UHPLC – QE – MS 及相关文献报道,选择清热解毒汤中 6 种重要活性成分,进一步检测其对 GM 患者 CK 分离株的体外抑制作用。结果表明,来源于黄芩的化合物黄芩素体外抗菌活性尤为显著,MIC 值可达(26.85 ± 9.77) mg · L^{-1};

其次为来源于连翘的化合物连翘酯苷 A，体外抑制 CK 菌株的 MIC 值为（161.13 ±99.72）mg · L^{-1}；来源于黄芩的另一化合物黄芩苷抑菌作用亦较为显著，MIC 值为（197.75 ±84.95）mg · L^{-1}；此外，槲皮素、连翘苷、木犀草素亦可发挥一定的抑菌作用，但作用效果相对较小（见表 5、图 3）。

表 5　清热解毒汤主要有效成分对 CK 的体外抑制作用　（$\bar{x} \pm s$，mg · L^{-1}）

中药化合物	MIC	中药化合物	MIC
黄芩素	26.85 ±9.77	连翘苷	1132.81 ±251.95
黄芩苷	197.75 ±84.95	槲皮素	249.02 ±140.39
连翘酯苷 A	161.13 ±99.72	木犀草素	1 113.28 ±1289.58

3.4　抗生素对 CK 分离菌株的药敏检测　基于 EUCAST 标准对 3 种常用抗生素 E－test 实验结果进行药物敏感性判读。结果发现，全部菌株对万古霉素敏感；80.65% 对头孢曲松敏感；54.84% 菌株对莫西沙星敏感，见表 6。

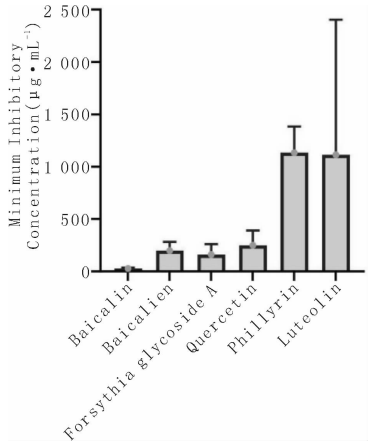


图 3　中药化合物对克氏棒状杆菌体外抑制作用的 MIC 柱状图

表 6　3 种抗生素对克氏棒状杆菌分离菌株的药敏检测

抗生素	MIC 截断值*（ρ/mg · L^{-1}）	MIC（ρ/mg · L^{-1}）	敏感［n（%）］	中介［n（%）］	耐药［n（%）］
头孢曲松	S，≤1；R，>2	0.50（0.22，1.0）	25（80.65）	1（3.23）	5（16.13）
莫西沙星	S，≤0.5；R，>0.5	0.064（0.047，1.5）	17（54.84）	0（0.00）	14（45.16）
万古霉素	S，≤2；R，>2	1.0（0.875，1.0）	31（100.00）	0（0.00）	0（0.00）

* 来源于 EUCAST

3.5　棋盘法检测抗生素联合清热解毒汤主要成分的体外抑菌作用　选择对 CK 分离菌株体外抑菌作用显著（MIC≤200 mg · L^{-1}）的 3 种中药单体化合物，即黄芩素、黄芩苷、连翘酯苷 A，利用棋盘法进一步探究其联合抗生素应用的效应关系。结果显示，除黄芩素与万古霉素联合应用时对 CK 菌株的抑制作用无关外，其余均为协同作用；其中，黄芩素联合头孢曲松、黄芩苷联合莫西沙星的协同作用较优（FICI 值分别为 0.562 7、0.569 1）。见图 4。

3.6　黄芩素对 CRO 耐药菌株的时间杀菌曲线　由于黄芩素对 CK 菌株的体外抑菌作用显著，且联合临床常用抗生素头孢曲松应用时为显著协同作用，因此，分别选择临床 CRO 敏感菌株及耐药菌株，进一步探究黄芩素对 CRO 耐药菌株的抑制作用。结果显示，对于临床 CRO 耐药菌株，黄芩素联合 CRO 应用时仍可发挥与 CRO 敏感菌株类似的体外抑菌作用，较单独应用 CRO 组作用显著，抑菌作用稳定，见图 5。

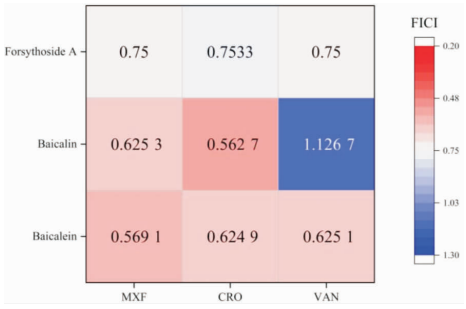


图 4　3 种中药单体及抗生素联合应用的 FICI 值热图（红色为协同作用，蓝色为无关作用）

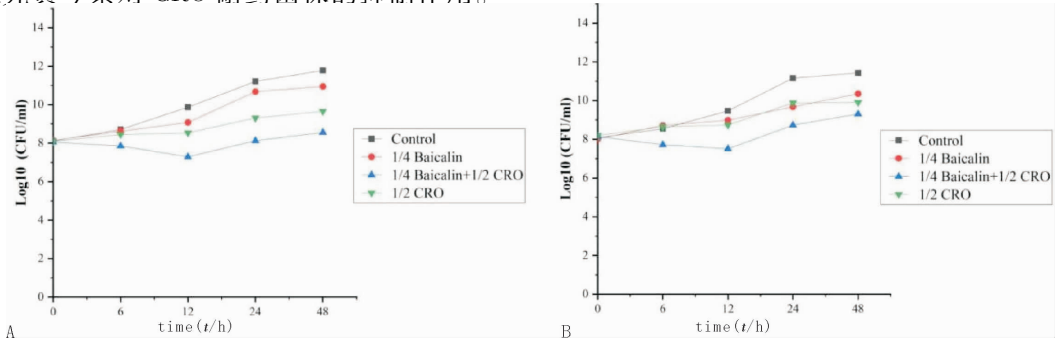


图 5　CRO 敏感菌株及耐药菌株的时间杀菌曲线（A 为敏感菌株，B 为耐药菌株）

4　讨论

近年来，肉芽肿性乳腺炎的发病率日益增高，无数育龄期女性患者深受其害，但其发病诱因仍未完全明确，在一定程度上限制了临床治疗方案的选择。目前 GM 治疗方案主要为手术治疗、糖皮质激素、抗生素治疗[10]，手术治疗虽可快速缩小病灶，但对乳房的毁形严重，且单纯手术治疗术后复发率高达 23% ~50%[11]；糖皮质激素治疗对抑制过度免疫、缩小肿物范围有一定效果，但较高的复发率令许多患者望而却步，且长期使用激素带来的不良反应如闭经、肥胖、消化道溃疡等，给患者增加了新的负担。

随着微生物检测技术的提高，CK 在乳腺炎性疾病中的检出率显著升高，使得细菌感染在乳腺炎发病诱因的相关研究中日益受到关注。CK 最早在 1998 年由 Collins 等[12]首次从人类痰液样本中分离出来，是一种革兰染色阳性的短小棒杆菌，兼性厌氧，不含分枝菌酸，无芽孢。既往研究对 CK 菌株的基因组序列分析，揭示了其亲脂性的特定生存条件[13]。临床分离的 CK 菌几乎全部来自女性乳腺炎患者。乳腺组织中脂肪含量较高，可能为其生长提供了有利条件。

目前已有大量研究支持 CK 感染与 GM 的发病存在密切相关性。2021 年一项通过 30 例新鲜乳腺炎标本的宏基因组测序技术分析结果发现，CK 检出率为 40%（10/25），由此推断 CK 可能为 GM 发病相关的主要病原体[14]。2023 年一项单中心回顾性队列研究显示，41 例 GM 患者中，11 例提示棒状杆菌感染[15]。此外还有研究发现，GM 的一种特殊病理类型囊性中性粒细胞性肉芽肿性乳腺炎，与 CK 的关系更加密切[16]。因此，在 GM 患者的临床治疗中，选择合理的抗菌治疗方案具有重要意义。但因细菌检出率较低，缺乏明确的用药指征及药物敏感性分析，导致目前抗生素治疗 GM 患者的临床有效率十分有限。

在此前提下，中医药治疗 GM 因其临床疗效显著，不良反应小，复发率较低等特点，日渐展现出显著的临床优势[17]。GM 属中医学“粉刺性乳痈、乳疽”等范畴。中医学认为，情绪影响、劳思倦怠或嗜食辛辣油腻食物致肝气不舒，脾失运化，气血津液运行失调，气滞血瘀，郁而化热，炼液为痰，痰瘀互结于乳房局部，发为乳房肿块[18]。基于现有文献对 GM 中医证型及证素的分析，发现火、毒病机占比最高（30.36%），清热解毒中药在临床应用中最为常见[19]。以清热解毒、消肿止痛为主要功效的清热解毒汤作为本院协定处方，已通过前期临床随机对照试验验证[7]，临床治疗 GM 疗效可靠，安全性较高，能够显著缩小患者乳房病灶范围，值得进一步深入探究其作用机制。

清热解毒汤方中生石膏、生知母为君药，清热泻火、滋阴润燥；臣药牡丹皮、赤芍清热凉血、活血止痛，蒲公英、连翘清热解毒、消肿散结，通过清血分、营分之邪助君药清热之功；佐药黄芩、板蓝根清热燥湿，荆芥穗疏风解表，助热从表解，白茅根凉血利尿，助热从小便而解。全方清热泻火解毒之力优异，治疗急性期、肿块期 GM 患者疗效尤为显著。但目前尚缺乏规范化的药物敏感性实验研究，限制了对清热解毒汤及中医药治疗在 GM 患者抗菌治疗方案中的应用推广。

本研究通过微量稀释法测定清热解毒汤对 GM 患者乳腺脓液标本中的 CK 分离菌株体外抑制作用的 MIC 值，发现清热解毒汤具有较为优异的体外抑菌作用。进一步检测其单味中药的体外抑菌作用，发现除石膏外各味中药均可发挥一定的抑菌作用，其中抑菌作用显著的中药主要为连翘、黄芩。为进一步明确清热解毒汤的主要活性抑菌成分，通过 UPLC－Q－TOF/MS 技术检测其主要活性成分，结果鉴定出的 67 种化合物中，大多数成分包括黄芩素、黄芩苷、连翘苷、连翘酯苷、木犀草素等，均经文献报道存在明确的抗菌活性，因此，可进一步证实在治疗 CK 感染相关的 GM 患者时，清热解毒汤能够发挥显著的抑菌作用。

针对 UPLC－Q－TOF/MS 及相关文献筛选出的可能发挥抑菌作用的中药单体化合物，进一步通过药敏实验，挖掘其通过抑菌作用治疗乳腺炎的临床价值。研究结果显示，黄芩素对 CK 分离株的体外抑制作用最为显著，中位 MIC 值可达 19.53 $mg \cdot L^{-1}$。除此之外，黄芩苷、连翘酯苷 A 对分离株的体外抑制作用也较为显著，且 31 株分离株之间的 MIC 值差异并不明显。

此外，本研究选用 3 种临床常用抗生素即头孢曲松、莫西沙星及万古霉素作为抗生素抑菌作用对照。E－test 实验结果显示，31 株分离株均对万古霉素高度敏感；对头孢曲松、莫西沙星部分敏感，CRO

药物敏感率为 80. 65%，MXF 药物敏感率为 54. 84%。同时，在检测上述抑菌作用显著的 3 种中药单体化合物联合抗生素的抑菌效能时发现，除黄芩素联合万古霉素显示为无关作用外，其余均为协同作用，尤其是黄芩素联合头孢曲松、黄芩苷联合莫西沙星，可显著增强对 CK 菌株的抑制作用。同时，时间杀菌曲线进一步显示，针对临床头孢曲松耐药菌株，黄芩素仍能发挥稳定可靠的抑菌作用，具有较大的潜在临床抗菌应用价值。

黄芩素、黄芩苷均是中药黄芩的主要有效成分，均为黄芩属开花植物中提取所得的天然黄酮类化合物，以其抗氧化和抗炎特性闻名。研究表明，黄芩素可通过抑制 PARP1 介导的 NF－κB 和 NLRP3 信号通路减轻 LPS 诱导的肠道炎症损伤[20]。黄芩素主要通过抑制生物膜相关基因表达发挥抗菌作用，并能够与抗生素协同作用，增加临床疗效[21]。而黄芩苷能通过抑制 TLR4/MyD88/TRIF 通路，减轻炎症模型大鼠的局部炎症反应[22]。同时研究表明，黄芩苷能通过多种作用机制发挥抗菌作用，包括细菌细胞壁的破坏、细菌细胞膜的损伤、生物膜结构的中断以及细菌凋亡[23]。以上研究均可表明来源于黄芩的天然化合物黄芩素、黄芩苷抗菌抗炎作用优异，具有较大的临床应用价值。此外，本研究结果发现，黄芩素对 CK 的抑制作用尤为显著，且对抗生素耐药菌株仍能发挥稳定抑菌作用，对 GM 的临床抗菌治疗具有重要潜在应用价值。

连翘酯苷 A 也是目前较为公认的抗炎抗菌天然化合物。连翘酯苷 A 是中药连翘中分离出的主要活性成分，具有抗炎、抗感染、抗病毒、抗氧化等多重药理作用。一项最新的研究显示，连翘酯苷 A 预处理可显著降低 LPS 诱导的炎症反应和线粒体损伤，促进线粒体自噬相关因子的表达[24]。同时，连翘酯苷 A 在类风湿性关节炎模型、神经炎症模型中也同样表现出显著的抗炎作用[25－26]。类似地，槲皮素是一种在多种传统中药材中广泛存在的类黄酮化合物，其抗氧化、抗炎作用已被诸多文献明确报道，且对多种微生物包括耐药菌株均具有抑制作用，其主要作用机制包括抑制细菌生长、生物膜形成、毒力因子和调节宿主免疫反应[27]。最新研究表明，槲皮素可以通过改变细菌细胞膜的完整性有效抑制细菌的生长[28]。因此，这些天然化合物可能为临床抗菌药物的选择及开发提供新的思路，并且可能会在未来获得更优异的临床疗效。

5　结语

综上，CK 感染与 GM 发生发展密切相关，抗菌治疗可能在其临床治疗中发挥重要作用。中医药治疗本病临床优势显著，其中，清热解毒汤治疗 GM 疗效明确。本研究表明，清热解毒汤对 GM 患者的 CK 分离株具有明确的体外抑制作用，其中，发挥主要抑菌作用的单味中药为连翘、黄芩。此外，通过 UHPLC－QE－MS 技术对清热解毒汤主要活性成分进行检测，研究发现，天然化合物黄芩素、黄芩苷、连翘酯苷 A 对分离株的抑制作用较为显著，其中黄芩素抑菌效能最为优异，且以上化合物在联合抗生素应用时大多可表现为协同作用。此外，针对临床抗生素耐药菌株，黄芩素仍能发挥稳定的抑菌作用，是理想的抗菌药物。因此，在 CK 感染相关的 GM 临床抗菌治疗中，清热解毒汤及其有效成分可能提供了一条新的治疗思路，值得未来深入研究。

参考文献：

[1]SARKAR D K，BANERJEE R，GUPTA S，et al. Management of idiopathic granulomatous mastitis：a prospective study[J]. Annals，2023，105(3)：218－224.

[2]WONG S C Y，POON R W S，CHEN J H K，et al. Corynebacterium kroppenstedtii is an emerging cause of mastitis especially in patients with psychiatric illness on antipsychotic medication[J]. Open Forum Infect Dis，2017，4(2)：ofx096.

[3]CHEN W，ZHANG D X，ZENG Y F，et al. Clinical characteristics and microbiota analysis of 44 patients with granulomatous mastitis[J]. Front Microbiol，2023，14：1175206.

[4]ONG S S，XU J，SIM C K，et al. Profiling microbial communities in idiopathic granulomatous mastitis[J]. Int J Mol Sci，2023，24(2)：1042.

[5]周瑶，赵丹，刘舒雷，等. 基于“玄府气液－阳热怫郁”理论辨治肉芽肿性小叶性乳腺炎[J]. 中国中医基础医学杂志，2023，29(12)：2109－2111.

[6]董兰蔚，叶媚娜，殷玉莲，等. 中医药内外合治对肉芽肿性乳腺炎的影响及作用机制研究[J]. 山东中医杂志，2021，40(12)：1326－1331，1336.

[7]张子辰，张董晓. 清热解毒方治疗肉芽肿性乳腺炎急性期的前瞻性随机对照研究[J]. 北京中医药，2023，42(7)：716－720.

[8]谢晓晨，陈雯，黄巧，等. 清热解毒汤治疗哺乳期急性乳

腺炎的回顾性研究[J]. 浙江中医药大学学报,2024,48(1):67 - 76.
[9]SANTOS N C S,SCODRO R B L,DE ALMEIDA A L,et al. Combinatory activity of linezolid and levofloxacin with antituberculosis drugs in Mycobacterium tuberculosis[J]. Tuberculosis,2018,111:41 - 44.
[10]COOMBE R F,HAMED H. An update on granulomatous mastitis:a rare and complex condition[J]. Br J Hosp Med,2021,82(5):1 - 7.
[11]SHOJAEIAN F,HAGHIGHAT S,ABBASVANDI F,et al. Refractory and recurrent idiopathic granulomatous mastitis treatment:adaptive,randomized clinical trial[J]. J Am Coll Surg,2024,238(6):1153 - 1165.
[12]COLLINS M D,FALSEN E,AKERVALL E,et al. Corynebacterium kroppenstedtii sp. nov. ,a novel Corynebacterium that does not contain mycolic acids[J]. Int J Syst Bacteriol,1998,48 Pt 4:1449 - 1454.
[13]TAUCH A,FERNáNDEZ - NATAL I,SORIANO F. A microbiological and clinical review on Corynebacterium kroppenstedtii[J]. Int J Infect Dis,2016,48:33 - 39.
[14]BI J X,LI Z X,LIN X,et al. Etiology of granulomatous lobular mastitis based on metagenomic next - generation sequencing[J]. Int J Infect Dis,2021,113:243 - 250.
[15]HOULIHAN E,RYAN K,MANNION J,et al. Idiopathic granulomatous mastitis:a 5 - year retrospective review of cases in a tertiary centre in Dublin,Ireland[J]. J Clin Pathol,2024,77(12):835 - 841.
[16]MAUNG M H,BETHUNE G C,PATRIQUIN G,et al. Cystic neutrophilic granulomatous mastitis - a review of 12 consecutive cases[J]. Histopathology,2020,77(5):781 - 787.
[17]郭鱼波,张董晓,赵文洁,等. 肉芽肿性乳腺炎中医药治疗的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2024,39(6):3018 - 3022.
[18]梁欢,张董晓,孙宇建,等. 从中医“痰邪致病”理论看肉芽肿性小叶性乳腺炎发病[J]. 北京中医药大学学报,2018,41(10):808 - 811.
[19]孙琪琦,张董晓. 肉芽肿性乳腺炎中医证型及证素分布特点的文献研究[J]. 辽宁中医杂志,2022,49(10):1 - 6.
[20]LU Q R,WANG N,WEN D F,et al. Baicalin attenuates lipopolysaccharide - induced intestinal inflammatory injury via suppressing PARP1 - mediated NF - κB and NLRP3 signalling pathway[J]. Toxicon,2024,239:107612.
[21]HAN J H,LUO J,DU Z Y,et al. Synergistic effects of baicalin and levofloxacin against hypervirulent Klebsiella pneumoniae biofilm in vitro[J]. Curr Microbiol,2023,80(4):126.
[22]JANTAN I,NORAHMAD N A. Inhibitory effect of food - functioned phytochemicals on dysregulated inflammatory pathways triggered by SARS - CoV - 2:a mechanistic review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr,2024:1 - 26.
[23]ZHANG J,LI Y H,XIE S B,et al. Baicalein glycymicelle ophthalmic solution:Preparation,in vitro antimicrobial activities,and antimicrobial mechanism evaluations[J]. Int J Pharm,2024,654:123964.
[24]LIU J J,GAO Y K,ZHANG H Q,et al. Forsythiaside A attenuates mastitis via PINK1/Parkin - mediated mitophagy[J]. Phytomedicine,2024,125:155358.
[25]SU M H,ZHOU D H,HUANG J M,et al. Forsythiaside A exhibits anti - migration and anti - inflammation effects in rheumatoid arthritis in vitro model[J]. Int J Rheum Dis,2024,27(1):e14976.
[26]SHAO S Y,ZHANG F,YANG Y N,et al. Neuroprotective and anti - inflammatory phenylethanoidglycosides from the fruits of Forsythia suspensa[J]. Bioorg Chem,2021,113:105025.
[27]CARRILLO - MARTINEZ E J,FLORES - HERNáNDEZ F Y,SALAZAR - MONTES A M,et al. Quercetin,a flavonoid with great pharmacological capacity[J]. Molecules,2024,29(5):1000.
[28]WANG S G,YAO J Y,ZHOU B,et al. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro[J]. J Food Prot,2018,81(1):68 - 78.

收稿日期:2024 - 11 - 29
作者简介:曾奕斐(1996 -),女,山东潍坊人,博士研究生,研究方向:中医药诊疗乳腺疾病。
通信作者:张董晓(1977 -),女,河南郑州人,医学博士,主任医师,研究方向:中医药诊疗乳腺疾病。E - mail:morningdong@163.com

编辑:纪彬