

N-乙酰半胱氨酸对慢性阻塞性肺疾病患者呼吸道病原菌抑制作用的影响因素分析

江苏海安县人民医院 唐佳佳*, 南通 226600

摘要 目的:分析 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者呼吸道病原菌抑制作用的影响因素。方法:选择重症 COPD 呼吸道感染的 90 例患者作为研究对象,采集所有患者痰液标本进行菌株分离培养,并观察不同浓度、作用时间、有机物质、pH 值及存放条件对 NAC 抑菌效果的影响。结果:90 例老年重症 COPD 呼吸道感染患者,共培养分离出 98 株病原菌,其中革兰阳性菌 25 株(25.51%),革兰阴性菌 57 株(58.16%),真菌 16 例(16.33%);5 mg/mL 的 NAC 溶液对 COPD 呼吸道感染常见病原菌抑菌率几乎均能达到 100%;2 mg/mL 的 NAC 溶液对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌作用 0.5 h 后即表现出十分明显抑菌效果;有机物质达到 8.0% 以上时,NAC 抑菌效果明显降低;pH 为 4.0 时,NAC 抑菌作用十分明显;NAC 溶液密封冷藏 3 d 后抑菌效果仍然较好,但室温存放 1 d 后抑菌效果明显下降。结论:NAC 对重症 COPD 呼吸道感染常见病原菌均具有理想抑菌效果,有机物质、pH 值以及存放条件均对 NAC 抑菌效果有明显影响。

关键词 N-乙酰半胱氨酸;慢性阻塞性肺疾病;呼吸道病原菌;抑菌作用

中图分类号 R563 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20170616

Factors influencing the inhibitory effect of N-acetylcysteine on respiratory pathogens in patients with chronic obstructive pulmonary disease TANG Jia-jia*, Jiangsu Hai'an People's Hospital, Nantong 226600, China

Abstract Objective: To investigate the factors influencing the inhibitory effect of N-acetylcysteine (NAC) on respiratory pathogens in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Methods: Ninety patients with severe COPD respiratory infection were selected. Sputum specimens from all patients were collected and strains were separated and cultured. The influences on NAC inhibitory effects from different concentrations, action time, organic matter, pH value and storage conditions were observed. Results: Ninety-eight strains of pathogenic bacteria were isolated and cultured from the 90 patients with severe COPD respiratory infection. There were 25 strains of Gram-positive bacteria (25.51%), 57 strains of Gram-negative bacteria (58.16%), and 16 strains of fungi (16.33%). The bactericidal rate of 5 mg/mL NAC solution to the common pathogenic bacteria of COPD respiratory tract was almost 100%. The inhibitory effect of 2 mg/mL NAC solution on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was significant after 30 min. When the organic matter was above 8%, the inhibitory effect of NAC was obviously reduced. When the pH was 4, the inhibitory effect of NAC was very obvious. The inhibitory effect of NAC solution was still good after being sealed and refrigerated for 3 days, but the inhibitory effect decreased obviously after 1-day storage at room temperature. Conclusion: NAC has an ideal inhibitory effect on the common pathogenic bacteria of severe COPD respiratory infection, while organic matters, pH value and storage conditions have an obvious effect on the inhibitory effect of NAC.

Key words N-acetylcysteine; Chronic obstructive pulmonary disease; Respiratory pathogen; Inhibitory effect

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种老年临床高发的呼吸系统疾病,易并发呼吸道感染^[1]。N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl cysteine, NAC)是一种临床常用祛痰药^[2]。NAC 作为巯基供给体,可以清除已生成自由基,并具有抑制自由基的生成的作用,因此广泛应用于临床神经系统、心血管系统及呼吸系统疾病治疗^[3]。此外,NAC 在体外可发挥一定抑菌效果^[4],但关于其抑菌作用的影响因素报道较少,本研究主要探讨

NAC 对老年重症 COPD 患者呼吸道病原菌抑制作用的影响因素。

资料与方法

一般资料 2014 年 6 月~2016 年 6 月在江苏海安县人民医院接受治疗的重症 COPD 呼吸道感染的老年患者 90 例(男 51,女 39),年龄为 60~89 岁,平均(76.5±4.1)岁。纳入标准:①符合中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》(2013 年修订版)^[5]中 COPD 相关诊断标准的患者;②符合《医院感染诊断标准》^[6]

* 通信作者:唐佳佳, E-mail: tangbao05@sina.com

中规定的有关医院呼吸道感染标准的患者;③近期发生呼吸困难加重、痰量增加及脓性痰增多等症状的患者。排除合并有其他呼吸系统疾病、严重精神疾病的患者,神志不清、难以有效沟通的患者。本研究方案已获得本院伦理委员会的批准。患者及其家属对本研究方案均详细了解,且自愿签署知情同意书。

方法 病原菌获取及鉴定:所有患者均于清晨起床后清水漱口,然后用力咳出喉管深部痰液存放至无菌盒中送检;对于气管插管患者,可通过一次性吸痰管采集深部痰液,并均采用同一方法及标准,采集同一部位痰液标本,病原菌感染诊断以同一病原菌连续 2 次以上培养阳性,并结合临床表现。菌株分离培养操作步骤严格参照中华人民共和国卫生部医政司《全国临床检验操作规程》(第 3 版)^[7]进行,菌株鉴定采用法国生物梅里埃 ATB 自动细菌鉴定仪(购自梅里埃诊断产品有限公司)进行鉴定,具体操作步骤严格按照使用说明书进行。

NAC 配制:精确称量 NAC(购自豆城化学产品商贸有限公司)500 mg,并置于无菌试管中,加入无菌 0.9% NaCl 溶液 5 mL 进行溶解,配制成 100 mg/mL 存储液现配现用。

影响因素

1. NAC 浓度:设置 6 个不同浓度梯度(0.4、0.8、1.0、2.0、3.0 以及 5.0 mg/mL)的 NAC 溶液,分别加入一定量各种菌悬液,主要包括:①革兰阴性菌:肺炎克雷伯氏杆菌、大肠埃希菌、食麦芽假单胞菌以及铜绿假单胞菌;②革兰阳性菌:肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌。使得各菌液最终浓度达到 104 cfu/mL 左右,充分混匀后,静置 40 min,然后分别进行活菌计数,以无菌 0.9% 氯化钠溶液作为对照,统计抑菌率。活菌数(cfu/mL) = 20 × 平板计数 × 稀释倍数;抑菌率(%) = (对照活菌数 - 某条件处理后活菌数)/对照活菌数 × 100%^[8]。

2. 作用时间:配制浓度为 2 mg/mL 的 NAC 溶液,各取 2 mL 分别加入等浓度(104 cfu/mL)金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌 50 μL 菌悬液,充分混匀,放置于室温,分别在 0.5、1、2、3 h 和 4 h 点进行摇匀,并取液 50 μL,进行活菌计数(平板倾注法),对照为无菌 0.9% 氯化钠溶液,基数为各时间点无菌氯化钠溶液平板活菌计数平均值,统计抑菌率,重复进行 2 次实验,取平均值。

3. 有机物质:分别将小牛血清加入到一定浓度 NAC 溶液中,并保证小牛血清最终浓度分别为 0、0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0%、10.0% 和

20.0%,并使得 NAC 溶液最终浓度为 4 mg/mL。向以上各溶液中分别加入一定量菌悬液(金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌),使得菌液最终浓度达到 104 cfu/mL 左右,充分混匀后,静置 40 min 后分别进行活菌计数,以无菌 0.9% NaCl 作为对照,统计抑菌率。

4. pH 值:将 100 mg/mL 的 NAC 溶液分别通过不同体积磷酸二氢钾溶液(1/15 mol/L)、磷酸氢二钠溶液(1/15 mol/L)以及氢氧化钠溶液(1 mol/L)进行调节,使得 NAC 最终浓度达到 20 mg/mL,并检测 pH 值,使其分别为 4.0、5.4、6.5、7.0 和 7.5,同时配置各 pH 相应 PBS 溶液,作为对照,检测方法同上。

5. 存放条件:分别将 100 mg/mL 的 NAC 溶液 15 mL 密封保存于 4℃ 和室温 2 个条件下,分别与 0、1、3、7、30 d 和 60 d 各取出 2 mL,并配置为最终浓度为 2 mg/mL 的溶液进行实验,检测方法同上。

结 果

呼吸道病原菌种类及构成比 90 例老年重症 COPD 呼吸道感染患者共培养分离出 98 株病原菌,其中革兰阳性菌 25 株(25.51%),以金黄色葡萄球菌为主;革兰阴性菌 57 株(58.16%),以大肠埃希菌为主;真菌 16 株(16.33%),以白假丝酵母菌为主,见表 1。

表 1 老年重症 COPD 患者呼吸道病原菌种类及构成比

病原菌种类	株数	构成比(%)
革兰阳性菌		
金黄色葡萄球菌	17	17.35
肺炎链球菌	8	8.16
革兰阴性菌		
大肠埃希菌	20	20.41
肺炎克雷伯氏杆菌	14	14.29
铜绿假单胞菌	12	12.24
嗜麦芽窄食假单胞菌	7	7.14
洛菲不动杆菌	4	4.08
真菌		
白假丝酵母菌	13	13.27
其他真菌	3	3.06

不同浓度 NAC 对老年重症 COPD 患者呼吸道常见病原菌抑菌作用 当 NAC 浓度为 5.0 mg/mL 时,对老年重症 COPD 患者呼吸道各种常见病原菌抑菌率均能达到 100.0%,可见 NAC 对老年重症 COPD 患者呼吸道感染具有良好抑菌效果,见表 2。

NAC 不同作用时间抑菌作用 2 mg/mL 的 NAC 溶液对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌作用

0.5 h后抑菌率分别为 85.7% 和 89.6%,作用 2 h 后抑菌率均能够达到 99% 以上,可见 2 mg/mL 的 NAC 溶液作用 0.5 h 即表现出十分明显抑菌效果,见表 3。

有机物质对 NAC 抑菌作用的影响 有机物质(小牛血清)对 NAC 抑菌效果影响较大,当 NAC 溶液中有有机物质含量达到 8.0% 以上时,NAC 对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑菌率均明显降低,见表 4。

pH 值对 NAC 抑菌作用的影响 pH 值为 5.4 ~ 7.5 的 NAC 溶液对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑菌效果均不明显。20 mg/mL 的 NAC 溶液 pH

值为 4.0 时,金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌计数结果均在 100 cfu/mL 左右,此时,NAC 溶液对两种细菌的抑菌效果十分明显,见表 5。

存在条件对 NAC 抑菌作用的影响 将 NAC 溶液密封冷藏(4℃)保存 3 d 后,对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑菌效果仍然可达到 100.0%,但在室温保存 1 d 后,NAC 溶液对 2 种细菌的抑菌效果均明显降低,见表 6。

讨 论

COPD 患者具有较常人更高的呼吸道感染率,

表 2 不同浓度 NAC 对细菌抑菌作用 (抑菌率,%)

病原菌	0.4 (mg/mL)	0.8 (mg/mL)	1.0 (mg/mL)	2.0 (mg/mL)	3.0 (mg/mL)	5.0 (mg/mL)	对照组计数 (cfu/mL)
金黄色葡萄球菌	39.4	42.7	65.1	93.2	97.5	100.0	3.2×10^4
肺炎链球菌	11.2	20.6	32.8	71.2	99.3	100.0	6.1×10^4
大肠埃希菌	52.7	80.8	92.1	98.7	99.0	100.0	4.9×10^4
肺炎克雷伯氏杆菌	91.9	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	5.3×10^4
铜绿假单胞菌	88.7	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	1.5×10^4
嗜麦芽窄食假单胞菌	86.1	95.4	97.0	99.6	100.0	100.0	9.6×10^4

表 3 NAC 不同作用时间抑菌作用效果 (抑菌率,%)

病原菌	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h
金黄色葡萄球菌	85.7	92.9	99.1	99.7	100.0
大肠埃希菌	89.6	94.3	99.6	100.0	100.0

注:对照组活菌数为 1.5×10^4 cfu/mL

表 4 有机物质含量对 NAC 抑菌作用的影响效果 (抑菌率,%)

病原菌	0	0.5	1	2	4	8	10	20
金黄色葡萄球菌	100.0	99.9	99.9	99.6	99.4	91.8	90.7	85.1
大肠埃希菌	100.0	99.9	99.9	99.9	99.9	96.4	91.0	76.5

注:大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌对照活菌分别为 1.2×10^5 cfu/mL 和 1.4×10^5 cfu/mL

表 5 pH 值对 NAC 抑菌作用的影响效果 (活菌数,cfu/mL)

病原菌	7.5	7.0	6.5	5.4	4.0
金黄色葡萄球菌					
NAC	7.8×10^4	7.9×10^4	8.0×10^4	6.8×10^4	100
PBS	8.3×10^4	8.4×10^4	8.2×10^4	8.0×10^4	7.4×10^4
大肠埃希菌					
NAC	8.2×10^4	8.1×10^4	7.8×10^4	7.7×10^4	95
PBS	8.5×10^4	8.3×10^4	7.9×10^4	8.0×10^4	7.6×10^4

表 6 存放条件对 NAC 抑菌作用的影响效果 (活菌数,cfu/mL)

病原菌	0	1	3	7	30	60
金黄色葡萄球菌						
4℃	0	0	0	100	300	2.9×10^4
室温	0	100	1000	6.3×10^3	2.5×10^4	4.8×10^4
大肠埃希菌						
4℃	0	0	0	80	200	2.4×10^4
室温	0	100	900	5.8×10^3	2.1×10^4	4.6×10^4

注:大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌对照活菌分别为 2.5×10^5 cfu/mL 和 2.3×10^5 cfu/mL

(下转第 500 页)

- review of the literature[J]. *Am J Emerg Med*, 2017, 21(6): 9241-9249.
- 5 Miao ZL, Hou AJ, Zang HY, et al. Effects of recombinant human brain natriuretic peptide on the prognosis of patients with acute anterior myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: a prospective, multi-center, randomized clinical trial[J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(1): 54-63.
 - 6 Nassiri AA, Hakemi MS, Safar-Pour R, et al. Association of serum intact fibroblast growth factor 23 with left ventricular mass and different echocardiographic findings in patients on hemodialysis[J]. *J Transl Int Med*, 2016, 4(3): 135-141.
 - 7 王霞, 杜倩, 晏江丽. N 末端脑钠肽前体对急性心肌梗死患者心脑血管事件的预测价值[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2016, 8(1): 57-59.
 - 8 Baktir AO, Dogan Y, Sarhl B, et al. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D levels and the SYNTAX score in patients with acute coronary syndrome[J]. *Anatol J Cardiol*, 2017, 2(1): 293-297.
 - 9 刘书宇, 宫剑滨, 叶沃若, 等. 冠状动脉介入治疗术前高负荷应用阿托伐他汀对急性心肌梗死患者临床预后的影响[J]. *中国综合临床*, 2016, 32(06): 509-512.
 - 10 王晓林, 张亚军, 霍建凤, 等. 血浆 B 型钠尿肽、肌钙蛋白对急性心肌梗死后心功能的预测价值[J]. *中国医药导刊*, 2016, 18(02): 140-141, 144.
 - 11 González-Pacheco H, Amezcua-Guerra LM, Sandoval J, et al. Prognostic implications of serum albumin levels in patients with acute coronary syndromes[J]. *Am J Cardiol*, 2017, 1(5): 977-983.
 - 12 Ferreira JP, Girerd N, Duarte K, et al. Serum chloride and sodium interplay in patients with acute myocardial infarction and heart failure with reduced ejection fraction: an analysis from the high-risk myocardial infarction database initiative[J]. *Circ Heart Fail*, 2017, 10(2): 9825-9829.
 - 13 邱崇荣, 睦建, 张倩, 等. 老年急性心肌梗死患者应激血糖和血清胱抑素 C 及肾小球滤过率与近期预后的关系[J]. *中华老年医学杂志*, 2016, 35(02): 163-167.
 - 14 Strand E, Pedersen ER, Svingen GF, et al. Serum acylcarnitines and risk of cardiovascular death and acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(2): 823-829.
 - 15 张倩, 王春梅, 艾辉, 等. 急性 ST 段抬高型心肌梗死患者早期低钾血症的发生情况及其与短期预后的相关性研究[J]. *中国医药*, 2016, 11(7): 945-948.
 - 16 Jo H, Her J, Lee H, et al. Highly sensitive amperometric detection of cardiac troponin I using sandwich aptamers and screen-printed carbon electrodes[J]. *Talanta*, 2017, 1(165): 442-448.
 - 17 Hsu JT, Chung CM, Chu CM, et al. Predictors of left ventricle remodeling: combined plasma B-type natriuretic peptide decreasing ratio and peak creatine kinase-MB[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(1): 75-85.
 - 18 寇民生, 耿丽群, 耿爱群. 血钾浓度对心肌梗死急性期预后的预测分析[J]. *中国实用医刊*, 2016, 43(21): 30-32.
 - 19 Barstow C, Rice M, McDivitt JD. Acute coronary syndrome: diagnostic evaluation[J]. *Am Fam Physician*, 2017, 95(3): 170-177.

(2017-01-18 收稿 2017-06-12 修回)

(上接第 497 页)

NAC 是一种呼吸科临床常用化痰药物, 研究表明, NAC 对一些革兰阳性球菌和革兰阴性杆菌均具有较为明显的抑菌效果^[9]。NAC 的抑菌机理主要与其能够竞争性抑制多种细菌利用半胱氨酸有关, NAC 中含有硫氢基, 该基团能够与细菌细胞壁蛋白质发生相互作用, 从而有效抑制细菌生长^[10]。本研究结果显示, NAC 对 COPD 呼吸道病原菌的抑菌效果均较为理想, 且该效果在一定范围内与 NAC 剂量相关, 本结果与 Mansourin 等^[11]研究报道一致。

NAC 是一种酸性物质, 本文发现, pH 值为 5.4~7.5 的 NAC 溶液和对照 PBS 溶液中活菌计数结果无明显差异, 抑菌或抑菌效果均不明显, 可见 NAC 抑菌效果主要与其自身相关, 而并非是偏酸环境导致的抑菌效果。此外, NAC 在偏碱性条件下的抑菌作用明显减弱, 具有 pH 值依赖性。同时, 本研究结果还发现 NAC 在半小时内即可发挥明显抑菌作用, 随着 NAC 作用时间延长, 其抑菌效果更为显著。但有机物质(小牛血清)和存储条件对 NAC 抑菌作用均存在一定影响, 提示, 当 NAC 溶液中有有机物质含量达到 8% 以上时, NAC 抑菌效果明显降低, 且 NAC 溶液需密封冷藏, 且应尽快用完, 最好能够现配现用。

参考文献

- 1 陈海清, 张雪岷, 惠平, 等. 血清 PCT 与 Hs2CRP 和 SAA 水平在老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期下呼吸道感染诊断中的临床意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(17): 3930-3932.
- 2 De Andrade KQ, Moura FA, dos Santos JM, et al. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: therapeutic possibilities of N-Acetylcysteine[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 30269-30308.
- 3 Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities[J]. *Brain Behav*, 2014, 4(2): 108-122.
- 4 Riise GC, Qvarfordt I, Larsson S, et al. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on adherence of streptococcus pneumoniae and haemophilus influenzae to human oropharyngeal epithelial cells in vitro[J]. *Respiration*, 2000, 67(5): 552-558.
- 5 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4): 484-491.
- 6 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)摘登(1)[J]. *新医学*, 2005, 36(8): 495-495.
- 7 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程(第 3 版)(精)[M]. 东南大学出版社, 2006, 736-923.
- 8 邹玉明, 肖金波, 胡艺, 等. N-乙酰半胱氨酸对呼吸道感染病原菌的抑菌作用及影响因素研究[J]. *现代预防医学*, 2016, 43(7): 1287-1290.
- 9 Rodríguez-Beltrán J, Cabot G, Valencia EY, et al. N-acetylcysteine selectively antagonizes the activity of imipenem in pseudomonas aeruginosa by an oprD-mediated mechanism[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(6): 3246-3251.
- 10 Parry MF, Neu HC. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro[J]. *J Clin Microbiol*, 1977, 5(5): 58-61.
- 11 Mansouri MD, Darouiche RO. In vitro antimicrobial activity of N-acetylcysteine against bacteria colonising central venous catheters. [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 29(4): 474-476.

(2017-03-28 收稿 2017-08-21 修回)