

芪归银方对抗生素体外抑制多重耐药铜绿假单胞菌作用的影响

孔令博¹ 刘清泉² 杨琦¹ 高洁³ 付跃峰¹

(1 北京中医药大学东直门医院,北京,100700; 2 首都医科大学附属北京中医医院,北京,100010; 3 中国人民解放军第306医院,北京,100101)

摘要 目的:探讨芪归银方含药血清联合抗生素对多重耐药铜绿假单胞菌的体外抑制作用。方法:运用二倍稀释法检测单用抗生素、空白血清、含药血清及血清联合抗生素的体外抑菌情况。结果:空白血清对多重耐药铜绿假单胞菌无体外抑菌作用,含药血清则具有明显的体外抑菌作用;抗生素联合含药血清较单纯抗生素和抗生素联合空白血清的抑菌情况有明显差异。结论:芪归银方含药血清能够降低抗生素的MIC值、MBC值,提高抑菌率,含药血清与抗生素具有体外协同抑菌作用。

关键词 芪归银方;含药血清;抗生素;多重耐药铜绿假单胞菌;体外抑菌

Study on the Effect of Qiguiyin Decoction and Antibiotics Inhibiting Multi-drug Resistant Pseudomonas Aeruginosa in Vitro

Kong Lingbo¹, Liu Qingquan², Yang Qi¹, Gao Jie³, Fu Yuefeng¹

(1 Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2 Beijing Chinese Medicine Hospital, Capital Medical University, Beijing 100010, China; 3 306 Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100101, China)

Abstract Objective: To explore the bacteriostasis effect of Qiguiyin decoction combined with antibiotics inhibiting multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa in vitro. **Methods:** The antibacterial situation of antibiotics, blank serum, Qiguiyin decoction - containing serum and Qiguiyin decoction & antibiotics-containing serum in vitro were detected with double dilution method. **Results:** Blank serum had no effect of bacteriostasis on multi-drug resistant PA, while Qiguiyin decoction-containing serum had significant effect of bacteriostasis on it, and there was significant difference between them. Besides, the serum with both Qiguiyin decoction and antibiotics showed more significant bacteriostasis effect. **Conclusion:** Qiguiyin decoction-containing serum could reduce the content of MIC, MBC in antibiotics and increase the bacteriostasis rate. Qiguiyin Decoction-containing serum and antibiotics have significant cooperation effect of bacteriostasis on PA in vitro.

Key Words Qiguiyin decoction; Qiguiyin decoction-containing serum; Antibiotics; Multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa; Bacteriostasis in vitro

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.03.007

由于第三代头孢菌素和碳青霉烯类抗生素在临床上的广泛应用,近年来多重耐药和泛耐药菌株的检出率不断增高,铜绿假单胞菌对 β -内酰胺酶类和碳青霉烯类抗生素的耐药性明显增加^[1-2]。其在国内各大医院细菌分离率调查中均居于首要位置^[3]。众所周知,抗生素的不合理使用是细菌耐药的根源,因此,目前无论是多粘菌素或多种抗生素联合应用,还是研发新型抗生素等都不能有效解决细菌耐药问题。而近年来的研究证实了中医药在细菌耐药方面极具良好的应用前景^[4]。现代药理学研究表明中药抑菌成分较多,可作用于细菌的不同部位和繁殖的不同阶段,并对细菌的多个代谢环节发挥作用,故不易产生耐药性^[5]。有鉴于此,本实验以芪归银方为对象,研究含药血清与抗生素的协同作用,具体如下。

1 材料

1.1 药物 芪归银方(黄芪60g、当归15g、金银花15g、青蒿10g、虎杖10g)提取物(1.0g/mL),由北京中医药大学中药学院中药研究室提供;头孢他啶(深圳致君制药有限公司,产品批号E20100102)、头孢哌酮舒巴坦钠(辉瑞制药有限公司生产,产品批号1039098)、亚胺培南西司他丁钠(Merck&Co., Inc. USA,产品批号100231),均购自北京中医药大学东直门医院药剂科,分别用生理盐水配制成512 μ g/mL、512 μ g/mL(以头孢哌酮的量计算)和128 μ g/mL(以亚胺培南的量计算)的溶液。

1.2 动物 SD大鼠16只,清洁级,体重200~220g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号SCXK-(军)2007-004。正常光照条件下,

食、水可自由摄取,室温控制在 18~22℃ 之间。

1.3 菌株 多重耐药铜绿假单胞菌临床分离株 1643 号,由首都医科大学附属北京朝阳医院细菌室提供。

1.4 试剂与设备 M-H 琼脂平板购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司(批号:XW01100301),立式自动电热压力蒸汽灭菌器(ASTELL 公司,型号:AMA440N),恒温培养箱(SAMYO 公司,型号:SIM-F124),涡混合器(Scientific Industries 公司,型号:VOR-TEX-GENIE 2),低温高速离心机(上海爱丁堡生物科技发展有限公司,型号:Kendro Labofuge 400R),微量天平(METTLER 公司,型号:AE100),酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司,型号:DNM-9602)。

2 方法

1)将 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组、芪归银方组,每组各 8 只,空白组予蒸馏水,芪归银方组给予芪归银方提取物灌胃,均为每日两次,每次 2 mL,共 5d,末次给药后 1 h,将各组大鼠予 10% 水合氯醛溶液,按 0.4 mL/100 g,腹腔注射麻醉后,腹主动脉采血,4℃ 离心,2500r/min,20 min,无菌分离血清,将各组 8 只大鼠血清混合后,56~60℃ 水浴 30 min,进行灭活。

2)在 24 孔板中分别依次加入 0.8 mL、0.4 mL、0.3 mL、0.2 mL、0.1 mL 的空白血清和含药血清,然后用 M-H 肉汤培养基将各孔补至 1 mL,再将含液体培养基的菌液(5×10^7 CFU/mL)取 10 μ L 加入各孔中,37℃,孵育 18~24 h。然后分别转种至含有 M-H 琼脂培养基的培养皿上,37℃,孵育 18~24 h。

3)在 24 孔板中加入 M-H 肉汤培养基 1 mL,再分别于每组的第一个空加入头孢他啶溶液、头孢哌酮舒巴坦钠溶液、亚胺培南西司他丁钠溶液,采用二倍稀释法将各孔依次对倍稀释,最终每个反应体系均为 1 mL,再将含液体培养基的菌液(5×10^7 CFU/mL)取 10 μ L 加入各孔中,37℃,孵育 18~24 h。然后分别转种至含有 M-H 琼脂培养基的培养皿上,37℃,孵育 18~24 h。

4)在 24 孔板中加入 M-H 肉汤培养基 0.5 mL,再分别于每组的第一个孔加入头孢他啶溶液、头孢哌酮舒巴坦钠溶液、亚胺培南西司他丁钠溶液 0.5 mL,采用二倍稀释法将各孔依次对倍稀释,每个反应体系均为 0.5 mL,再向每个孔加入 M-H 肉汤培养基 0.3 mL 和灭活后的两种血清 0.2 mL,最终每个反应体系均为 1 mL,其中血清的含量均为 20%,然后将含液体培养基的菌液(5×10^7 CFU/mL)取 10 μ L 加入各孔中,37℃,孵育 18~24 h。然后分别转种至培养皿,37℃,孵育 18~24 h。

3 结果

1)空白血清和给予大鼠等效剂量芪归银方提取物灌胃后得到的含药血清在反应体系中占 80% 时,仍无体外抑菌作用。见表 1。

表 1 空白血清和含药血清对多重耐药铜绿假单胞菌的抑菌作用

血清种类 \ 血清含量	80%	40%	30%	20%	10%
空白血清	+++	+++	++++	++++	++++
含药血清	++	+++	++++	++++	++++

注:阳性对照(++++)。

2)单纯头孢他啶 MIC 值为 64 μ g/mL,联合空白血清后 MIC 值仍为 64 μ g/mL,联合含药血清后其 MIC 值降为 32 μ g/mL;单纯头孢哌酮舒巴坦钠 MIC 值为 64 μ g/mL、MBC 值为 256 μ g/mL,联合空白血清后其 MIC 值无变化,联合含药血清后其 MIC 值和 MBC 值均有明显下降;单纯亚胺培南西司他丁钠 MIC 值为 32 μ g/mL,联合空白血清后其 MIC 值和 MBC 值变化不明显,联合含药血清后其 MIC 值降至 8 μ g/mL, MBC 值为 16 μ g/mL。见表 2。

表 2 单纯抗生素与抗生素联合血清对多重耐药铜绿假单胞菌的 MIC、MBC 值

药物	MIC 值(μ g/mL)	MBC 值(μ g/mL)
头孢他啶	64	—
头孢他啶 + 空白血清	64	128
头孢他啶 + 含药血清	32	128
头孢哌酮舒巴坦钠	64	256
头孢哌酮舒巴坦钠 + 空白血清	64	64
头孢哌酮舒巴坦钠 + 含药血清	16	32
亚胺培南西司他丁钠	32	64
亚胺培南西司他丁钠 + 空白血清	32	32
亚胺培南西司他丁钠 + 含药血清	8	16

注:抗生素联合血清对多重耐药铜绿假单胞菌的 MIC、MBC 值为其反应体系中抗生素的浓度。

表 3 相同抗生素浓度下单纯抗生素与抗生素联合血清对多重耐药铜绿假单胞菌的抑菌率

抑菌率(%) \ 抗生素浓度(μ g/mL)	64	32	16	8	4	2
头孢他啶	100	39.79	0	0		
头孢他啶 + 空白血清	100	57.49	0	0		
头孢他啶 + 含药血清	100	100	66.97	36.12		
头孢哌酮舒巴坦钠		100	34.12	0.74		
头孢哌酮舒巴坦钠 + 空白血清		100	71.78	0.901		
头孢哌酮舒巴坦钠 + 含药血清		100	100	25.18		
亚胺培南			94.65	8.85	6.31	0
亚胺培南西司他丁钠 + 空白血清			100	28.36	3.45	0
亚胺培南西司他丁钠 + 含药血清			100	76.27	53.27	41.79

注:抗生素联合血清浓度为其反应体系中抗生素的浓度。

3)将 24 孔板中各反应体系用加样器取 20 μ L 加至 96 孔板中,每个反应体系 3 个副孔,经酶标仪检测

各孔样本 570 nm 的 OD 值,求平均值,得出抑菌率。结果表明,在同一抗生素浓度下,抗生素联合含药血清组的抑菌率均明显高于单纯抗生素组和抗生素联合空白血清组。见表 3、图 1。

$$\text{抑菌率}(100\%) = \frac{\text{同一样本 OD 值的平均值}}{\text{阳性对照孔 OD 的平均值}} \times 100\%$$

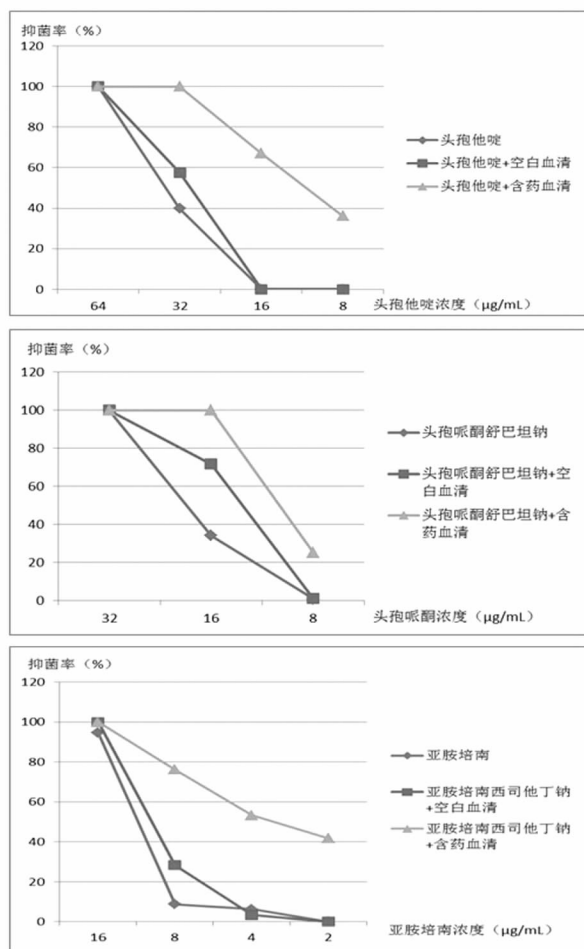


图 1 相同抗生素浓度下单纯抗生素与抗生素联合血清对多重耐药铜绿假单胞菌的抑菌率趋势图

4) 经东直门医院细菌室菌种鉴定,各组均为铜绿假单胞菌;药敏结果显示,含药血清组和亚胺培南西司他丁钠+含药血清组转种后的铜绿假单胞菌对头孢哌酮舒巴坦钠耐药性为中介, MIC 值为 32 μg/mL,对其他抗生素耐药。其余各组转种后的铜绿假单胞菌对药敏试验所用抗生素均耐药,与实验菌株的药敏结果一致。

4 讨论

铜绿假单胞菌(PA)具有较强的快速适应能力,其产生多重耐药性的机制复杂,对某一类抗菌药物的耐药往往是几种机制协同作用的结果,对不同抗菌药物的耐药机制也不完全相同,而且还不断有新的耐药机制出现,目前已知的耐药机制主要有^[6]:1)产生纯化

酶,如 β-内酰胺酶、氨基糖苷类修饰酶等;2)基因突变,如 DNA 拓扑异构酶及 DNA 回旋酶突变、主动外排泵系统的过量表达等;3)生物被膜;4)DNA 错配修复系统。

基于中医药抗感染的历史经验和优势,近年来在中医药治疗耐药菌感染方面已有一些研究。夏金尧等^[7]研究证实滇产五倍子、白芍等 9 种中草药对产超广谱 β-内酰胺酶耐药大肠埃希菌具抑菌作用,对标准菌抗菌活性较大的提取物对耐药菌也具有较大的抗菌活性。肖洋等^[8]研究结果表明五倍子提取液对铜绿假单胞菌 R 质粒具有较好的消除作用。席清平等^[9]研究显示五倍子可抑制葡萄糖基转移酶活性,抑制葡聚糖生成,从而阻止生物膜形成。上述研究表明中药具有抑制耐药菌的作用,并能针对某些耐药机制逆转细菌耐药性,为中医药有效治疗耐药菌感染提供有力的依据,但是目前对中药与抗生素之间的联合作用研究较少。毋庸置疑,抗生素的杀菌、抑菌效果无可比拟,中药远远不及。从实验结果中也可以看出,提高头孢哌酮舒巴坦钠和亚胺培南西司他丁钠的浓度后二者还是能够起到对多重耐药铜绿假单胞菌 1643 号菌株的抑菌作用,但是,临床上不可能为了达到抗生素的抑菌作用而无限地提高抗生素的剂量。因此,本实验以芪归银方和抗生素是否存在协同抑菌作用为研究对象,观察含药血清联合抗生素的体外协同抑菌作用,其结果显示头孢他啶、头孢哌酮舒巴坦钠和亚胺培南西司他丁钠三种抗生素联合芪归银方含药血清与单用抗生素体外抑菌效果有明显的差异,含药血清能够有效降低上述三种抗生素的 MIC、MBC 值,提高抗生素的抑菌率,增强其抑菌、杀菌作用,为芪归银方联合抗生素有效治疗多重耐药菌感染提供了实验依据。提示芪归银方含药血清可能能够作为抗生素的“增敏剂”,降低耐药菌对抗生素的耐药程度,从而增强抗生素的疗效,减少抗生素的使用,缩短抗生素的使用时间。值得注意的是,药敏结果显示含药血清组和亚胺培南西司他丁钠+含药血清组转种后的铜绿假单胞菌对头孢哌酮舒巴坦钠耐药性为中介, MIC 值为 32 μg/mL,提示芪归银方含药血清可能能够逆转耐药菌的耐药性,使其对原本耐药的抗生素重新恢复敏感。本课题组相关研究亦证实了这种可能性的存在,即芪归银方含药血清对 β-内酰胺酶水解具有明显的抑制作用^[10],凸显了其解决细菌耐药这一棘手难题的潜力。同时,实验所用芪归银方,选用黄芪、当归补气养血以扶正,金银花、青蒿、虎杖清热解毒以透邪,组方切合耐药菌感染

(下接第 295 页)

- (1):230-240.
- [4] 刘一娜, 马晓春. 脓毒症相关肝损伤 49 例临床分析[J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32(11): 916-918.
- [5] Clifford SD, Maurizio CE, Andrew O, et al. Sepsis-induced cholestasis, steatosis, hepatic injury, and impaired hepatocellular regeneration are enhanced in interleukin-6[J]. Crit Care Med, 2006, 34(10): 2613-2620.
- [6] 崔金玲, 任新生. 脓毒症发生早期肝功能障碍的临床研究[J]. 岭南急诊医学杂志, 2007, 12(4): 251-252.
- [7] Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, et al. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes[J]. Crit Care Med, 2001, 29(Suppl7): S42.
- [8] Brienza N, Dalfino L, Cinnella G, et al. Jaundice in critical illness: Promoting factors of a concealed reality[J]. Intensive Care Med, 2006, 32: 267.
- [9] 曾红科, 江稳强. 脓毒症时肝功能不全[J]. 继续医学教育, 2008, 22(1): 11-15.
- [10] Muftuoglu MA, Aktakin A, Ozdemir NC. Liver injury in sepsis and abdominal compartment syndrome in rats[J]. Surg Today, 2006, 36(6): 519-521.
- [11] Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD. Apoptotic cell death in patients with sepsis shock and multiple organ dysfunction[J]. Crit Care Med, 1999, 27: 1230-1251.
- [12] Haendeler J, Messmer UK, Brune B, et al. Endotoxic shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2[J]. Shock, 1996, 6(6): 105-109.
- [13] Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6 and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis[J]. Biol. Chem, 2001, 276: 7320-7326.
- [14] Yoram G, Weiss LB, Patrick KK, et al. Compensatory hepatic regeneration after mild, but not fulminant, intraperitoneal sepsis in rat[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280: G968-G973.
- [15] Baveja R, Kresge N, Ashburn JH, et al. Potentiated hepatic microcirculatory response to endothelin-1 during polymicrobial sepsis[J]. Shock, 2002, 18(5): 415-422.
- [16] Singer M, De Santis V, Vitale D, et al. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated metabolic response to overwhelming systemic inflammation[J]. Lancet, 2001, 361: 515-518.
- [17] Scheller K, Seibel P, Sekeris CE. Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells[J]. Int Rev Cytol, 2003, 222: 1-61.
- [18] Breavle D, Karyampudi S, Jacques TS, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 286: R191-R197.
- [19] Keller SA, Paxian M, Lee SM, et al. Kupffer cell ablation attenuates cyclooxygenase-2 expression after trauma and sepsis[J]. J Surg Res, 2005, 124: 126-133.
- [20] Sener G, Arbak S, Kurtaran P, et al. Estrogen protects the liver and intestines against sepsis-induced injury in rats[J]. J Surg Res, 2005, 128(1): 70-78.
- [21] O'Leary MJ, Ferguson CN, Rennie MJ, et al. Sequential synthesis changes in vivo muscle and liver protein and plasma and tissue glutamine levels in sepsis in the rat[J]. Clin Sci, 2001, 101(3): 295-304.
- [22] Moseley RH. Sepsis and cholestasis[J]. Clin Liver Dis, 2004, 8: 183-191.
- [23] Whitins JF, Green RM, Rosenluth AB, et al. Tumor necrosis factor decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis[J]. Hepatology, 1995, 22(1): 1273-1278.
- [24] Lee SM, Park MJ, Cho TS, et al. Hepatic injury and lipid peroxidation during ischemia and reperfusion[J]. Shock, 2000, 13(4): 279-281.

(2014-02-17 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 290 页)

正虚邪伏的中医病机^[11], 具有通过调节感染引起的炎症反应和免疫紊乱达到增强临床抗耐药菌感染疗效的潜力与优势, 值得进一步研究。

参考文献

- [1] 曹彬. 多药耐药革兰阴性菌肺炎的抗感染治疗[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2008, 7(1): 3-5.
- [2] 孙景勇, 倪语星, 汪复, 等. 2007 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(3): 192-195.
- [3] 许宏涛, 宣天芝, 陶凤荣, 等. 3 种非发酵革兰阴性杆菌 5 年的分离率及耐药趋势回顾[J]. 中国临床药理学杂志, 2004, 20(3): 219-221.
- [4] 蒋培余. 中药抑制逆转细菌耐药性的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 53-55.
- [5] 刘莎, 符州. 黄芪的免疫调节作用及其临床应用[J]. 国际中医中药杂志, 2006, 28(4): 203-206.
- [6] 胡琴, 陆学东, 陈群. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(3): 358-360.
- [7] 夏金尧, 左国营, 王根春, 等. 滇产中草药体外抗产超广谱 β -内酰胺酶耐药大肠埃希菌的筛选研究[J]. 西南国防医药, 2009, 19(7): 664-666.
- [8] 肖洋, 黄红兰, 华芳. 五倍子对铜绿假单胞菌 R 质粒消除作用的实验研究[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(2): 55-56.
- [9] 席清平, 唐荣银, 王秦芳, 等. 五倍子在人工口腔中抗菌斑生物膜作用的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14(3): 148-150.
- [10] 高洁, 刘清泉, 田金洲, 等. 芪归银方对耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药作用的影响[J]. 中医杂志, 2012, (16): 1408-1411.
- [11] 高洁, 刘清泉, 马群, 等. 从伏邪理论看耐药菌感染[J]. 中医杂志, 2011, 52(6): 536-538.

(2014-02-17 收稿 责任编辑: 洪志强)