

文章编号: 1674-8085(2021)02-0094-04

藁苳与抗生素配伍前后对金黄色葡萄球菌 抑菌效果的比较

蒋 平^{1,2}, 李雅茹¹, 孙桃桃^{1,2}, 陶 颖¹, 张新义¹, 倪仁洁¹, 汪 磊¹, *黄仁术^{1,2}

(1. 皖西学院生物制药工程学院, 安徽, 六安 237012; 2. 安徽省中药资源保护与持续利用工程实验室, 安徽, 六安 237012)

摘 要: 目的 为了探讨常用抗生素与藁苳配伍后的联合抑菌效果。方法 使用藁苳、头孢拉定、左氧氟沙星、头孢曲松、青霉素和头孢呋辛为试验药物, 使用金黄色葡萄球菌作为试验菌种, 采用倍比稀释法和棋盘稀释法分别检测最小抑菌浓度和联合抑菌浓度指数。结果 表明藁苳、青霉素、头孢拉定、头孢曲松、头孢呋辛、左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度分别为 32 mg/mL 和 0.25、2、2、0.5、0.125 $\mu\text{g/mL}$, 藁苳分别与头孢曲松、青霉素联用后表现为相加作用, 藁苳分别与头孢拉定、头孢呋辛联用后表现为无关作用, 藁苳与左氧氟沙星联用后表现为拮抗作用。结论 表明藁苳分别与头孢曲松、青霉素联用可以达到高效抑制金黄色葡萄球菌的作用, 对藁苳临床应用具有参考意义。

关键词: 藁苳; 抗生素; 金黄色葡萄球菌; 最小抑菌浓度; 联合抑菌指数

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2021.02.016

COMPARISON OF ANTIBACTERIAL EFFECT AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BEFORE AND AFTER THE COMBINATION OF *ZINGIBER MIOGA* WITH COMMON ANTIBIOTICS *IN VITRO*

JIANG Ping^{1,2}, LI Ya-ru^{1,2}, SUN Tao-tao^{1,2}, TAO Ying¹, ZHANG Xin-yi¹, NI Ren-jie¹,
WANG Lei¹, *HUANG Ren-shu^{1,2}

(1. College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an, Anhui 237012, China;

2. Anhui Engineering Laboratory for Conservation and Sustainable Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Lu'an, Anhui 237012, China)

Abstract Objective: To investigate the antibacterial effect of common antibiotics combined with *Zingiber mioga* *in vitro*. **Methods:** *Zingiber mioga*, penicillin, cefradine, ceftriaxone, cefuroxime and levofloxacin were selected as investigational drug, and the *Staphylococcus aureus* was selected as the tested bacterium, and then the method of double dilution and chessboard dilution method were used to detect the minimal inhibitory concentration and fractional inhibitory concentration, respectively. **Results:** The results showed that the minimal inhibitory concentration of *Z. mioga*, penicillin, cefradine, ceftriaxone, cefuroxime and levofloxacin were 32 mg/mL, 0.25

收稿日期: 2020-10-12; 修改日期: 2021-01-07

基金项目: 国家中药材产业技术体系(CARS-21); 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2018A0413, KJ2017a407); 安徽省本科质量工程项目(2016sjjd079, 2018zygc075, 2018jyxm1153, 2018jyxm1155, 2018SXZX49); 国家大学生创新创业训练项目(201910376056); 皖西学院本科质量工程项目(wxy2017116, wxy2018026, WXXY2019006); 皖西学院自然科学重点项目(WXZR201932); 皖西学院自然科学研究项目(WXZR201629); 安徽省高校优秀拔尖人才培养项目(gxgnfx2018027), 皖西学院校级扶贫专项(WXZR201740)

作者简介: 蒋 平(1989-), 男, 安徽定远人, 助教, 从事中西药药理及中药应用研究(E-mail:837264050@qq.com);

李雅茹(1996-), 女, 安徽宿州人, 皖西学院生物制药工程学院动物科学专业 2016 级本科生(E-mail:3034125357@qq.com);

孙桃桃(1992-), 女, 安徽亳州人, 助教, 硕士, 主要从事中西药药理及中药应用研究(E-mail:694536660@qq.com);

陶 颖(1998-), 女, 安徽芜湖人, 皖西学院生物与制药工程学院动物科学专业 2017 级本科生(E-mail:3029145791@qq.com);

张新义(1998-), 男, 安徽蒙城人, 皖西学院生物与制药工程学院动物科学专业 2017 级本科生(E-mail:407091299@qq.com);

倪仁洁(1997-), 女, 安徽芜湖人, 皖西学院生物与制药工程学院动物科学专业 2017 级本科生(E-mail:1324196221@qq.com);

汪 磊(2001-), 女, 安徽安庆人, 皖西学院生物与制药工程学院动物医学专业 2018 级本科生(E-mail:1141950082@qq.com);

*黄仁术(1977-), 女, 新疆阿克苏人, 教授, 硕士, 主要从事天然活性物质及中西药药理研究(E-mail:ahhs@126.com).

$\mu\text{g/mL}$, $2\ \mu\text{g/mL}$, $2\ \mu\text{g/mL}$, $0.5\ \mu\text{g/mL}$ and $0.125\ \mu\text{g/mL}$, respectively. It showed the additive action in antibacterial effect for the combination of *Z. mioga* with penicillin or ceftriaxone, independent action for the combination with cefradine or cefuroxime, and antagonistic action for the combination with levofloxacin.

Conclusion: The combination of *Z. mioga* and penicillin or ceftriaxone can effectively inhibit the *S. aureus*, which has a reference for the clinical application.

Key words: *Zingiber mioga*; antibiotics; *Staphylococcus aureus*; minimal inhibitory concentration; fractional inhibitory concentration

近年来由于抗生素的广泛使用带来了诸多问题,其中最突出的问题就是细菌耐药性,尤其是超级细菌的出现,给人们的生命安全带来极大的影响。屠银芳等^[1]在妇幼感染中耐药金黄色葡萄球菌研究中发现,金黄色葡萄球菌对大环内酯类、林可酰胺类、青霉素类出现较高的耐药性,其中青霉素的耐药率高达75%以上。庞伟斌等^[2]分别对临床标本和食品中分离的金黄色葡萄球菌进行耐药性检测,发现金黄色葡萄球菌对临床常用的苄青霉素、红霉素、四环素等耐药率较高。可见在临床和食品中,金黄色葡萄球菌耐药性越发严重,会直接导致临床中可选用的抗生素种类越来越少。

为了有效的解决抗生素耐药越发严重等问题,近年来国内学者从中药的角度来考虑抗菌抑菌的问题,以期缓解抗生素耐药性的问题。但是中药的抗菌效果不及抗生素,致使其在临床中很少单独使用;而多与抗生素一起联合应用。目前已发现,苦参^[3]、勒马回^[4]、胆木^[5]等多种中药具有提高抗生素抗菌效果和降低抗生素使用量的作用,有效的减缓细菌耐药性的产生。但是在中西药联用时也要考虑药物之间的配伍效应,防止药物之间拮抗和不良反应的发生。

囊荷是一种食药兼用的保健型植物,其根、茎、花、叶均可制药,具有消食健胃、清理肠道、活血化瘀、祛痰止咳、温中理气等功效。黄仁术等^[6]研究发现囊荷提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均具有显著的抑制作用。但是,囊荷与抗生素的联合后对金黄色葡萄球菌的抑菌效果相关文献少见。因此,本试验主要探究囊荷及其与抗生素的联合用药后对金黄色葡萄球菌抑菌效果,以期对临床治疗细菌性疾病的提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

金黄色葡萄球菌标准株(CMCC 26112),购自北京豫鼎鑫捷科技有限公司。

1.2 药品和试剂

囊荷采自大别山区,并由皖西学院黄仁术教授鉴定;青霉素钠(国药准字H20033946,鲁抗医药股份有限公司);头孢拉定(国药准字H44023313,广州白云山天心制药股份有限公司);头孢曲松钠(国药准字H10920097,深圳华润九新药业有限公司);头孢呋辛钠(国药准字H20051155,华北制药河北华民药业有限责任公司);盐酸左氧氟沙星注射液(国药准字H19990324,扬子江药业集团有限公司);LB液体(批号为20170921),购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;LB固体(批号为20171030-00),购自杭州微生物试剂有限公司;MH固体(批号为20180223001),购自杭州百思生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 囊荷的提取

在冷凝回流装置中加入5 g囊荷和425 mL 95%乙醇溶液,并置于95℃水浴锅中加热1 h。使用定性滤纸乘热过滤,过滤液旋转蒸发仪浓缩至50 mL,再将浓缩液放入水浴锅除去乙醇,并使用蒸馏水定容,所得囊荷工作液浓度为0.5 g/mL。

1.2.2 抗生素工作液制备

称取适量青霉素、头孢拉定、头孢曲松、头孢呋辛和左氧氟沙星置于100 mL容量瓶中,使用生理盐水定容至工作液浓度为500 $\mu\text{g/mL}$,4℃保存备用;

1.2.3 培养基的配制

按照说明书的要求配置MH琼脂培养基、LB琼脂培养基和LB肉汤培养基,调节pH值至 7.2 ± 0.1 ,高压灭菌,备用。

1.2.4 菌液制备

取出冻存的金黄色葡萄球菌，将其接种到 LB 固体培养基上培养 24 h (37 ℃) 进行活化，取 1~3 个单菌落接种到 LB 液体培养基中，在 37 ℃ 恒温摇床培养 24 h 后计数，临用前血细胞计数法计数，稀释菌液浓度至 1.5×10^5 CFU/mL。

1.2.5 最小抑菌浓度测定 (MIC)

按照美国临床试验国家标准委员会 (NCCLS) 推荐的方法：将各个抗生素工作液和囊荷工作液分别加入已灭菌的 MH 琼脂培养基中，使 MH 琼脂培养基中抗生素终浓度 16、8、4、2、1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{g/mL}$ ，囊荷终浓度为 256、128、64、32、16、8、4、2、1 mg/mL ，之后将含药培养基倒入 6 孔板中；另取不含药的 MH 琼脂培养基倒入 6 孔板中作为阴性和阳性对照，冷凝备用。

向含药培养基孔和阳性对照孔的培养基中分别加入 100 μL 金黄色葡萄球菌的菌液 (1.5×10^5 CFU/mL)，阴性对照组中加入等量的生理盐水，用涂布器涂布均匀。37℃ 恒温培养箱中培养 24 h，随后观察以无菌生长的最低浓度为 MIC，每个浓度做 3 个重复，重复 3 次。

1.2.6 体外联合抑菌 (FIC) 指数的测定

采用棋盘稀释法^[5]测定囊荷与头孢拉定、左氧氟沙星、头孢曲松、青霉素、头孢呋辛联合用药时

对金黄色葡萄球菌的抑菌效果。以抗生物和囊荷单用时 MIC 值的 2 倍、1 倍、0.5 倍、0.25 倍、0.125 倍为组合，方法同“最小抑菌浓度 (MIC) 测定”。并按照公式计算 FIC 指数[FIC 指数=(甲药联合时的 MIC /甲药单用时的 MIC)+(乙药联合时的 MIC /乙药单用时的 MIC)]，药物的配伍效应按照表 1 分析。每个浓度做 3 个重复，重复 3 次。

表 1 配伍效应分级标准

Table 1 Classification criteria for compatibility effects

FIC 值范围	配伍效应
$\text{FIC} \leq 0.5$	协同作用
$0.5 < \text{FIC} \leq 1$	相加作用
$1 < \text{FIC} \leq 2$	无关作用
$\text{FIC} > 2$	拮抗作用

2 结果与分析

囊荷与抗生素 MIC 检测的结果表明，囊荷、青霉素、头孢拉定、头孢曲松、头孢呋辛、左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度分别为 32 mg/mL 和 0.25、2、2、0.5、0.125 $\mu\text{g/mL}$ ，囊荷分别与头孢拉定、头孢呋辛联用后表现为无关作用，囊荷与左氧氟沙星联用后表现为拮抗作用，囊荷分别与头孢曲松、青霉素联用后表现为相加作用。

表 2 囊荷与五种抗生素联合用药时体外抑菌指数

Table 2 the FIC results of Zingber mioga and five antibiotics combinations

联合药物	囊荷		头孢拉定		左氧氟沙星		头孢曲松		青霉素		头孢呋辛		FIC 值	作用效应
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC		
	单	合	单	合	单	合	单	合	单	合	单	合		
囊荷+青霉素	32000	16000							0.25	0.125			1	相加
囊荷+头孢拉定	32000	16000	2	1.5									1.25	无关
囊荷+头孢曲松	32000	16000					2	1					1	相加
囊荷+头孢呋辛	32000	16000									0.5	0.5	1.5	无关
囊荷+左氧氟沙星	32000	64000			0.125	0.0625							2.5	拮抗

3 讨论

囊荷味辛、性温，具有活血调经、祛痰止咳、解毒消肿等功效。可用于跌打损伤、咳嗽气喘、痈疽肿毒等病治疗，并具有良好的抗菌效果^[6]。本课题组前期研究发现，囊荷多糖和总黄酮对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌具有明显的体外抑制作用^[6-7]。王玉荣等^[8]研究发现，囊荷花蕾甲醇提取物对金黄

色葡萄球菌和沙门氏菌有较强抑菌作用，表明囊荷可以有效的抑制金黄色葡萄球菌，并表现出一定的优势。与抗生素相比，囊荷抗菌作用不是依靠单一成分，而是囊荷多成分的协同作用。吕晴等^[9]和 Lee 等^[10]研究发现，囊荷中含有 β -榄香烯、 β -石竹烯、 α -水芹烯、 β -水芹烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯等多种抗菌活性成分，这些活性成分具有较好的抗菌作用。刘松鑫^[11]发现 β -榄香烯可通过抑制金黄色葡萄球菌细

胞膜完整性、可溶性蛋白和核酸合成来细菌的生长,可造成菌体破裂、死亡。由于抗生素的长期滥用易导致主要病原菌出现耐药性,通过中草药与抗生素类联用可达到一定的协同作用,弥补中草药和抗菌素单独使用药效不足等问题^[12]。

由于抗生素滥用导致超级细菌等耐药菌的出现,而使用传统中药替代抗生素应用于临床抗菌抑菌治疗的呼声越来越高,并且许多专家学者在这一方面取得诸多成果。景明来等^[13]通过抗菌药物与中药联合治疗妇科慢性盆腔感染时发现,中西医结合治疗的临床效果明显优于仅用中医治疗者。房华等^[14]研究发现,亚胺培南与小檗碱、头孢他啶与五倍子联合可以增加各自对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的敏感性。本研究通过棋盘稀释法测定囊荷与抗生素的联合抑菌指数,结果表明囊荷分别与头孢曲松、青霉素联用后表现为相加作用。与上述结论相似;表明中西药联用会增强抗生素的抗菌能力。

但是,我们在临床用药时应注意中药与抗生素联用存在严格的配伍效应。蔡长春等^[15]研究发现,头孢唑林、头孢呋辛、左氧氟沙星、克林霉素与清开灵注射液、双黄连粉针剂联合应用后,抗生素MIC值显著的下降,但其在对86例医院内金黄色葡萄球菌感染患者的调查中发现,单独使用抗菌药物治疗的45例,无不良反应发生;联合中药制剂治疗的41例患者中,有2例出现皮疹。姜永祥等^[16]认为中西药联合应用可能产生的不良反应或负向作用,如含有机酸类的中药不宜与磺胺类、氨基糖苷类、制酸药同服,可能会降低其疗效,增加其毒性,从而增加医疗事故的发生率;梁生林等^[17]发现,喹诺酮类抗菌药能降低氨茶碱的总清除率,升高血药浓度而导致中毒反应。本研究也发现,囊荷分别与头孢拉定、头孢呋辛联用后表现为无关作用,与左氧氟沙星联用后表现为拮抗作用,表明中药与抗生素的联用不是简单的两两相加,必须做好充分的临床应用及临床前研究,防止医疗事故的发生。

参考文献:

[1] 屠银芳,付燕,朱燕,等.妇幼感染中金黄色葡萄球菌的耐药性与抗菌药物相关性分析[J].中国药业,2020,29(4):

53-56.

- [2] 庞伟斌,高涛.临床标本和食品中金黄色葡萄球菌的耐药性分析研究[J].医学动物防制,2016,32(11):1187-1189.
- [3] 蒋平,马慧娟,戴书杰,等.苦参与抗生素配伍后对金黄色葡萄球菌抑菌效果的比较[J].宜春学院学报,2018,40(9):26-28+94.
- [4] 蒋平,张亚妮,高群,等.勒马回与抗生素配伍前后对金黄色葡萄球菌抑菌效果的比较[J].黑龙江畜牧兽医,2019,568(4):150-151,159.
- [5] 蒋平,李小慧,高群,等.胆木提取液与抗生素配伍对金黄色葡萄球菌的抑制效果[J].贵州农业科学,2018,46(11):79-82.
- [6] 黄仁术,刘仁妮,钱艳琳,等.囊荷总黄酮的提取工艺及其体外抑菌活性研究[J].食品与生物技术学报,2017(05):82-88.
- [7] 黄仁术,汪莹,陈坤,等.囊荷多糖的提取工艺及其体外抑菌活性研究[J].吉林农业,2018,30(14):53-55.
- [8] 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.
- [9] 吕晴,秦军,陈桐.气相色谱-质谱法分析囊荷花穗挥发油化学成分[J].理化检验-化学分册,2004,40(7):405-407.
- [10] Lee J W, Chon S U, Han S K, et al. Effects of Antioxidant and Flavor Compionents of Zingiber mioga Rosc[J]. Korean J Medicinal Crop sci, 2007, 15(3). 203-209.
- [11] 刘松鑫.紫茎泽兰挥发油的提取分离及抗菌作用初探[D].重庆:重庆医科大学,2012.
- [12] 徐晓津,李秀华,马一帆,等.复方中草药及其与抗生素联用对斜带石斑鱼溶藻弧菌病的治疗效果[J].水产学报,2019,43(5):1338-1346.
- [13] 景明来,王芬娟,陈萍,等.抗菌药物与中药联合治疗妇科盆腔感染临床有效性评价[J].中华医院感染学杂志,2014,24(4):869-870,879.
- [14] 房华,汪瑞忠,张晓雪.中西药联合逆转多重耐药铜绿假单胞菌抗菌活性研究[J].医药前沿,2017,7(29):389-391.
- [15] 蔡长春,李景苏.中西抗菌药物联合治疗医院感染金黄色葡萄球菌的合理性评价[J].中华医院感染学杂志,2003,12(7):666-668.
- [16] 姜永祥,薛洁.中西药联合使用可能出现的不良反应或负向作用[J].新疆中医药,1999,17(1):45.
- [17] 梁生林,曾红.氨茶碱与他药合用时应注意相互影响[J].井冈山学院学报,2008,29(4):66-67.