

文章编号: 1674-8085(2020)06-0103-04

岩黄连与抗生素配伍后对金黄色葡萄球菌体外抑菌效果的比较

孙桃桃^{1,2}, 蒋平^{1,2}, 钟枝梅¹, 方妍¹, 杨雨晴¹, 单浩浩¹, *左瑞华^{1,2}

(1. 皖西学院生物与制药工程学院, 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** 为了探讨岩黄连与抗生素配伍后体外联合抑菌效果。**方法** 使用岩黄连、青霉素、左氧氟沙星、磷霉素、头孢拉定作为试验药物, 以金黄色葡萄球菌作为试验菌株, 采用倍比稀释法测定岩黄连与四种常用抗生素的最小抑菌浓度, 采用棋盘稀释法测定岩黄连与四种抗生素的联合抑菌浓度。**结果** 岩黄连、青霉素、左氧氟沙星、磷霉素和头孢拉定最小抑菌浓度分别为 20 mg/mL、0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、0.5 μg/mL 和 1 μg/mL; 岩黄连与青霉素、头孢拉定、左氧氟沙星联用后表现为协同作用; 岩黄连与磷霉素联用后表现为无关作用。**结论** 岩黄连与青霉素、头孢拉定、左氧氟沙星联用可达到高效抑制金黄色葡萄球菌的作用, 对临床应用具有一定的参考意义。

关键词: 岩黄连; 抗生素; 最小抑菌浓度; 体外联合抑菌; 金黄色葡萄球菌

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2020.06.020

BACTERIOSTATIC OF *CORYDALIS SAXICOLA* COMBINED WITH ANTIBIOTICS ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN VITRO

SUN Tao-tao^{1,2}, JIANG Ping^{1,2}, ZHONG Zhi-mei¹, FANG Yan¹, YANG Yu-qing¹, SHAN Hao-hao¹,
*ZUO Rui-hua^{1,2}

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

2. The Center of Engineering and Technology of the Health Breeding and the Animal Disease Surveillance and Early Warning, West Anhui University, Liu'an, Anhui 237012, China)

Abstract Objective: To investigate the bacteriostatic effect of *Corydalis saxicola* combined with antibiotics *in vitro*. **Methods:** *C. saxicola* Bunting (CSB), penicillin, levofloxacin, fosfomycin sodium and cefradine were selected as investigational drugs, and *Staphylococcus aureus* was selected as investigational strains, and then we used the method of double dilution to detect the minimal inhibitory concentration of CBS and four drugs, and the fractional inhibitory concentration of CBS was detected by chessboard dilution method in alliance with penicillin, cefradine, levofloxacin and fosfomycin sodium. **Results:** The minimum inhibitory concentrations of

收稿日期: 2020-06-20; 修改日期: 2020-09-18

基金项目: 国家中药材产业技术体系(CARS-21); 安徽省本科质量工程项目(2016sjjd079, 2018zygc075, 2018jyxm1153, 2018jyxm1155); 皖西学院教学研究项目(wxyy2018026, wxyy2017078); 皖西学院林下种草养鹅生态养殖模式与示范项目(WXZR201743); 国家大学生创新创业训练项目(201810376058); 安徽省地方科技创新项目-科技惠民示范工程(202007d07050003); 安徽省大别山等革命老区和贫困县专项(201904f06020008); 皖西学院自然科学重点项目(WXZR201932); 皖西学院研究性学习项目wxyyx2019140

作者简介: 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);

蒋平(1989-), 男, 安徽滁州人, 硕士, 助教, 主要从事中西药药理及中药应用研究(E-mail: 837264050@qq.com);

钟枝梅(1999-), 女, 安徽滁州人, 皖西学院生物与制药工程学院动物医学专业 2017 级本科生(E-mail: 1946870243@qq.com);

方妍(1998-), 女, 安徽滁州人, 皖西学院生物与制药工程学院动物医学专业 2017 级本科生(E-mail: 2829868283@qq.com);

杨雨晴(1999-), 女, 安徽宣城人, 皖西学院生物与制药工程学院动物医学专业 2017 级本科生(E-mail: 1209426928@qq.com);

单浩浩(1996-), 男, 安徽亳州人, 皖西学院生物与制药工程学院动物医学专业 2017 级本科生(E-mail: asd1670224861@163.com);

*左瑞华(1965-), 女, 安徽界首人, 高级实验师, 硕士, 主要从事中西药药理及中药应用研究(E-mail: 646923623@qq.com).

CBS, penicillin, levofloxacin, fosfomycin sodium and cefradine were 20 mg/mL, 0.25 μ g/mL, 0.5 μ g/mL, 0.5 μ g/mL and 1 μ g/mL, respectively. The fractional inhibitory concentration of CBS showed the synergistic action combined with penicillin, cefradine or levofloxacin, and indifference action combined with fosfomycin sodium.

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

Key words: *Corydalis saxicola* Bunting; antibiotics; minimum inhibitory concentration; fractional inhibitory concentration; *Staphylococcus aureus*

近年来, 抗生素药物的快速发展和广泛使用, 使细菌性感染类疾病在治疗过程中出现了很多问题, 如细菌耐药性和耐药菌的传播等^[1]。何源等^[2]对重庆市生牛乳中金黄色葡萄球菌耐药谱调查发现, 检出的金黄色葡萄球菌对于青霉素 G、红霉素、克林霉素、四环素、头孢他啶、苯唑西林、头孢唑肟、诺氟沙星、环丙沙星等均有不同程度的耐药, 其中对青霉素 G 耐药性最强, 高达 89.19%, 其次为红霉素、克林霉素, 分别为 62.16%, 60.16%, 而四重耐药的金黄色葡萄球菌高达 35.14%。可见细菌耐药性之严重, 导致在临床中可用的抗生素种类越来越少。

虽然抗菌中药的使用, 可以有效缓解细菌耐药性等问题, 但由于中药的抗菌效率不及抗生素, 导致其在临床抗感染过程中很少单独使用; 而大多与抗生素一起联合应用于抗感染治疗。谢思露等^[3]研究发现, 水飞蓟宾和青霉素联合用药, 对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的抑菌有相加作用, 水飞蓟宾和红霉素联合用药对金黄色葡萄球菌的抑菌有相加作用, 对表皮葡萄球菌的抑菌效果有协同作用。这说明中药与西药联用可以有效增强临床抗菌药效, 降低抗生素的使用量。但是在临床应用时应注意中药和西药之间的配伍效应。

岩黄连为罂粟目罂粟科中草药, 具有清热解毒、利湿、止痛止血等功效, 对腹泻、痢疾等疾病有很好疗效。同时也有研究报道, 岩黄连内的巴马汀成分对肠道致病菌和化脓性球菌也有明显抑菌作用^[4]。但是, 岩黄连对金黄色葡萄球菌的抑菌效果及其与抗生素的联合抑菌效果却不知晓。因此, 本试验主要探究岩黄连及其与抗生素的联合用药后对金黄色葡萄球菌抑菌效果, 以期对细菌性疾病的的治疗提供参考。

1 材料

1.1 菌种

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

1.2 药品和试剂

岩黄连, 购自成都潜禧草堂; 注射用青霉素钠, 批号:H45021515, 购自于桂林南药股份有限公司; 注射用头孢拉定, 批号: H20067737, 购自于山东鲁抗医药股份有限公司; 注射用磷霉素钠, 批号 H43020770, 购自于湖南科伦制药有限公司; 左氧氟沙星, 批号: 170714022-A, 购自六安华源制药有限公司。LB 琼脂, 批号: 20171030-00, 杭州微生物试剂有限公司; LB 液体, 批号: 20170921, 青岛海博生物科技有限公司; MH 琼脂, 货号: HB6232, 青岛海博生物技术有限公司。

2 方法

2.1 岩黄连药液的制备

取适量干燥的岩黄连饮片, 研磨, 过 80 目筛, 准确称取岩黄连粉末 50 g 置于烧杯中, 加 250 mL 纯水, 混匀, 浸泡 30 min, 进行 2 次水提, 合并 2 次滤液, 离心除质, 减压浓缩, 加水定容, 使岩黄连生药浓度为 1 g/mL, 高压灭菌, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 抗生素工作液的配制

将头孢拉定、磷霉素钠和青霉素用生理盐水配成终浓度为 0.5 mg/mL。而左氧氟沙星原液浓度为 0.5 mg/mL。

2.3 培养基的配制

根据说明书配置 LB 琼脂培养基和 LB 肉汤培养基, 调节 PH, 高压灭菌; 量取配好的 MH 琼脂培养基 5 mL 于离心管中, 高压灭菌后, 备用。

2.4 悬菌液的制备

按照四区划线法将活化的金黄色葡萄球菌菌液接种到 LB 琼脂培养基上, 37℃, 培养 24 h, 使用接种针挑取 1~2 个细菌菌落接种到 LB 液体培养基中, 在恒温条件下, 摇床摇动 24 h。血球计数板计数, 将金黄色葡萄球菌浓度稀释到 1.5×10^5 CFU/mL。

2.5 最小抑菌浓度 (MIC) 测定

按照美国临床实验室国家标准委员会 (NCCLS) 推荐的方法, 向已灭菌的 MH 琼脂培养基中加入抗生素工作液和岩黄连药液, 使得抗生素终浓度为: 16、8、4、2、1.0、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{g/mL}$, 岩黄连药液的终浓度为 320、160、80、40、20、10、5、2.5、1.25 mg/mL 。每次实验分别作 3 个阴性对照和阳性对照组。混匀, 加入到 6 孔板里, 待冷凝备用。

分别向含药培养基和阳性对照组各孔中加入 100 μL 菌液 (1.5×10^5 CFU/mL), 阴性对照组加入等量的生理盐水。涂布后, 37℃ 培养, 24 h 后观察试验结果, 本试验以无金黄色葡萄球菌生长的浓度为 MIC。每个试验进行 3 次重复, 每个浓度也做 3 次重复。

2.6 体外联合抑菌试验 (FIC)

采用棋盘稀释法来分别测定岩黄连药液与头

孢拉定、左氧氟沙星、青霉素、磷霉素联合使用时对金黄色葡萄球菌的抑菌效果, 以各药单测时 MIC 值的 2 倍、1 倍、0.5 倍、0.25 倍、0.125 倍组合, 测定步骤同“2.5 最小抑菌浓度 (MIC) 测定”。并按照下面 FIC 计算公式计算其 FIC, 每个试验进行 3 次重复, 每个浓度也做 3 次重复。

$$FIC = \frac{\text{甲药联合时的MIC}}{\text{甲药单测时的MIC}} + \frac{\text{乙药联合时的MIC}}{\text{乙药单测时的MIC}}$$

表 1 配伍效应分级标准^[5]

Table 1 Classification standard of compatibility of medicines

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

3 结果

如表 2 所示, 头孢拉定、左氧氟沙星、青霉素、磷霉素、岩黄连药液对金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、20 mg/mL 。根据 FIC 值的判断标准, 岩黄连与磷霉素联用后 $1 < FIC \leq 2$, 表现为无关作用; 岩黄连与头孢拉定、青霉素、左氧氟沙星联用后 $FIC \leq 0.5$, 表现为协同作用。

表 2 岩黄连与四种抗生素联合用药时对金黄色葡萄球菌体外抑菌作用

Table 2 Inhibitory effect of CSB combined with four antibiotics on Staphylococcus aureus in vitro

联合药物 MIC/ $\mu\text{g/mL}$	岩黄连		头孢拉定		左氧氟沙星		磷霉素		青霉素		FIC	作用效应
	MIC 单	MIC 合	MIC 单	MIC 合	MIC 单	MIC 合	MIC 单	MIC 合	MIC 单	MIC 合		
岩黄连+头孢拉定	20	5	1	0.125							0.375	协同
岩黄连+左氧氟沙星	20	5			0.5	0.125					0.5	协同
岩黄连+磷霉素	20	20					0.5	0.125			1.5	无关
岩黄连+青霉素	20	5							0.25	0.03125	0.375	协同

4 讨论

岩黄连, 其味苦、性凉, 具有清热解毒、利湿、止痛止血等功效, 对腹泻、痢疾、口舌糜烂等病症具有很好疗效。王奇志等^[6]研究发现, 岩黄连中含有去氢岩黄连碱、小檗碱、巴马汀、黄连碱等成分。Aghayan 等^[7]研究发现, 小檗碱和巴马汀对烧伤后感染的铜绿假单胞菌具有明显的抑制作用。

Severina 等^[8]研究发现, 小檗碱和巴马汀能通过金黄色葡萄球菌菌膜的多抗药性泵, 从而达到抑制金黄色葡萄球菌生长的作用。这也表明岩黄连具有抗菌抑菌的作用。本研究结果表明, 岩黄连的 MIC 为 20 mg/mL , 具有相对高效的抑菌效果。

虽然中药具有相对高效的抑菌效果, 但是由于多数中药在临床抑菌抗菌方面起效慢, 很难进行大面积的推广应用。中西药联合使用可以有效解决中

药起效慢等问题。李学思等^[9]研究发现,青霉素 G 与黄芩、黄连素等联用具有较好抑制金黄色葡萄球菌的作用;罗开碧等^[10]用黄连、三七、蒲公英等中草药与抗生素联用治疗猪圆环病毒与细菌混合感染,结果使治愈率提高 5.55%,表明中药能有效增强抗生素的临床疗效,或二者之间具有较好的协同作用。本研究结果表明,岩黄连与青霉素、头孢拉定、左氧氟沙星联用后表现为协同作用;岩黄连与磷霉素联用后表现为无关作用。

虽然中西药联用有许多优势,但是不合理的中西药结合使用反而会产生药效拮抗、增强毒性、不良反应等,这给临床上会带来很大的危害^[11]。韩莹等^[11]发现,洋金花等与强心苷类药物联用易引起患者中毒。陈四玉等^[12]的研究发现,清开灵与头孢曲松钠联用后对金黄色葡萄球菌的抑制呈拮抗作用。研究表明不合理的中西药联合应用不仅危害机体的健康,而且会增加患者的经济成本,造成资源的浪费。因此,中西药联用要更加科学、合理、规范。

参考文献:

- [1] 李文印. 细菌耐药现状和抗菌药物的临床应用策略[J]. 中华全科医学, 2006, 4(6): 728-729.
- [2] 何源,王红,刘晓朋,等. 重庆市生牛乳中金黄色葡萄球菌的污染状况及耐药性调查的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(19): 2858-2859.
- [3] 谢思露,赵茂吉,杨朝国. 水飞蓟宾及其同分异构体的抑菌谱及其与抗生素联合抑菌效应探讨[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1641-1648.
- [4] 孙宁玲,陆国才,袁伯俊,等. 岩黄连研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 78-80.
- [5] 王方舟. 磷霉素对产 KPC 酶肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性及耐药机制研究[D]. 北京:中国人民解放军医学院, 2018.
- [6] 王奇志,梁敬钰,原悦. 岩黄连化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(1): 31-34.
- [7] Aghayan S S, Kalalian H M, Fazli M, et al. The effects of berberine and palmatine on efflux pumps inhibition with different gene patterns in pseudomonas aeruginosa isolated from burn infections [J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2017, 9(1): 2-7.
- [8] Severina I I, Muntyan M S, Lewis K, et al. Transfer of cationic antibacterial agents berberine, palmatine, and benzalkonium through bimolecular planar phospholipid film and Staphylococcus aureus membrane[J]. Iubmb Life, 2001, 52(6): 321-324.
- [9] 李学思,咎文华. 中药与抗生素联合对耐药葡萄球菌抗菌作用的实验研究[J]. 微生物学研究与应用, 1990, 2(1): 20-24.
- [10] 罗开碧,熊开明. 中草药配合抗生素对猪圆环病毒与细菌混感的疗效观察[J]. 农业与技术, 2015, 35(19): 122-123.
- [11] 韩莹. 浅析中西药不合理应用引起的毒副作用[J]. 当代医药论丛, 2012, 10(12): 449-450.
- [12] 陈四玉,杨明川,杨孜生,等. 7 种常用抗生素与清开灵配伍前后体外抑菌作用比较[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 280-282.