

多种中药对泛耐药肺炎克雷伯菌体外抗菌活性筛选

程招敏^{1,2}, 陈泳余¹, 彭方³, 蓝锴^{1,2}, 周强^{1,2}, 柯培锋^{1,2}

[摘要] 目的:筛选对泛耐药肺炎克雷伯菌有抗菌活性的中药,并初步探究其体外抑菌机制。方法:从 60 种中药颗粒剂中,筛选对 28 株泛耐药菌有体外抗菌活性的中药。调整有抗菌活性药液 pH 至中性,比较调整 pH 前后抑菌效果差异。检测有抑菌活性中药的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)、联合抑菌效果以及对细菌细胞外碱性磷酸酶(ALP)活性改变。结果:筛选出黄芩、黄连、麻黄和鸡血藤等 4 种对泛耐药菌均有抑菌作用的中药,其 MIC 依次为:64、64(82.1% 黄连菌株)、128(19.9%)、128、256 mg/mL;MBC 依次为:128、64(28.6% 黄连菌株)、128(71.4%)、256、512 mg/mL。4 种中药调整 pH 前后抑菌效果均无差异($P>0.05$)。黄连和黄芩联合应用时的 FIC 值均 >2 。随着 4 种药物浓度的增加,ALP 的浓度均升高,其中黄芩和黄连作用后的 ALP 浓度升高更为明显。结论:黄芩、黄连、麻黄和鸡血藤具有良好的体外抗菌效果,其中黄芩和黄连的抗菌机制可能与增加细胞膜的通透性有关;但黄芩和黄连联合用药有拮抗作用。

[关键词] 中药颗粒剂;泛耐药;肺炎克雷伯菌;最小抑菌浓度;最小杀菌浓度

[中图分类号] R 282.5

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.04.025

Screening of the traditional Chinese medicine with antibacterial activity against pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in vitroCHENG Zhao-min^{1,2}, CHEN Yong-yu¹, PENG Fang³, LAN Kai^{1,2}, ZHOU Qiang^{1,2}, KE Pei-feng^{1,2}

(1. The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510120;

2. Department of Clinical Laboratory Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510120;

3. Department of Clinical Laboratory Medicine, Meizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Meizhou Guangdong 514071, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the traditional Chinese medicine with antibacterial activity against pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*, and explore its antibacterial mechanism in vitro. **Methods:** Among 60 traditional Chinese medicine granules, Chinese medicines with antibacterial activity against 28 pan-resistant strains were screened. The pH value of the antibacterial active liquid was adjusted to neutral, and the antibacterial effects were compared between before and after adjusting pH value. The minimum inhibitory concentration(MIC), minimum bactericidal concentration(MBC), combined bacteriostatic effects and changes of extracellular alkaline phosphatase(ALP) activity of these Chinese medicines with antibacterial activity were detected. **Results:** Four kinds of traditional Chinese medicine with antibacterial activity against pan-resistant bacteria were screened out, which included the *Scutellariae Radix*, *Coptis Rhizoma*, *Ephedrae Herba* and *Spatholobi Caulis*. The MIC of the *Scutellariae Radix*, *Coptis Rhizoma*, *Ephedrae Herba* and *Spatholobi Caulis* was 64 mg/mL, 64 mg/mL, 128 mg/mL, 128 mg/mL and 256 mg/mL, respectively. The MBC of the *Scutellariae Radix*, *Coptis Rhizoma*, *Ephedrae Herba* and *Spatholobi Caulis* was 128 mg/mL, 64 mg/mL, 128 mg/mL, 256 mg/mL and 512 mg/mL, respectively. The differences of the antibacterial effects in four kinds of traditional Chinese medicine between before and after adjusting pH value were not statistically significant ($P>0.05$). The FIC values of the combined application of *Scutellariae Radix* and *Coptis Rhizoma* were more than 2. With the increasing of the concentrations of four drugs, the concentrations of ALP increased, and the increasing degree of ALP concentration was more obvious after *Scutellariae Radix* and *Coptis Rhizoma* treated. **Conclusions:** *Scutellariae Radix*, *Coptis Rhizoma*, *Ephedrae Herba* and *Spatholobi Caulis* have good antibacterial effect in vitro, the antibacterial mechanism of *Scutellariae Radix* and *Coptis Rhizoma* may be related to the increasing of membrane permeability, but the combination of *Ephedrae Herba* and *Spatholobi Caulis* has antagonistic effect.

[Key words] traditional Chinese medicine granule; pan-drug resistant; *Klebsiella pneumoniae*; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration

[收稿日期] 2019-10-28 [修回日期] 2020-02-16

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(20181102)

[作者单位] 1. 广州中医药大学第二临床学院, 广东 广州 510120; 2. 广东省中医院 检验科, 广东 广州 510120; 3. 广东省梅州市中医院 检验科, 514071

[作者简介] 程招敏(1986-), 男, 硕士, 主管技师。

[通信作者] 柯培锋, 主任技师。E-mail: kevinland020@163.com

肺炎克雷伯菌是医院感染的常见病原菌之一, 是引起呼吸道、泌尿生殖道、伤口、血液和中枢神经系统等部位感染的重要病原菌。随着抗生素的广泛使用, 肺炎克雷伯菌耐药性日趋严重, 已成为全球重点关注的耐药菌之一^[1]。泛耐药肺炎克雷伯菌是

指对包括黏菌素和替加环素在内的所有分类的常用抗生素都耐药的肺炎克雷伯菌^[1],泛耐药菌给临床抗感染治疗带来极大挑战。因此,探求新的药物和途径治疗泛耐药菌引起的感染势在必行。近年来,关于中药抗菌活性的研究逐渐增多^[2-3],但由于目前大部分中药抗菌作用机制不明确^[3],且同一种中药对不同病原菌的抗菌活性不同,因此,需要针对具体的病原菌筛选具体抗菌活性的中药。本研究从60种临床常用的中药配方颗粒中,筛选对泛耐药肺炎克雷伯菌具有抗菌活性的中药,并初步探究具有抗菌活性中药的作用机制以及药物间的相互作用,旨在为泛耐药肺炎克雷伯菌的中药治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 本研究中的28株泛耐药肺炎克雷伯菌,分离于2014-2018年就诊于广东省中医院的患者。标本来源于痰、肺泡灌洗液、血液、脓液、伤口分泌物、尿液等,剔除分离于同一病人的重复菌株。质控菌株大肠埃希菌 ATCC8739 和 ATCC25922 购自美国典型菌种保藏中心。

1.1.2 中药 实验的中药均为中药配方颗粒,购于广东一方制药有限公司。60种中药配方颗粒分别为:黄芩、黄连、细辛、薄荷、赤芍、麻黄、黄柏、金银花、白芍、连翘、紫草、淡附片、仙鹤草、侧柏叶、甘草、知母、苦参、地榆、姜黄、乌梅、丹参、三七、白前、大黄、麦冬、白花蛇舌草、夏枯草、山楂、板蓝根、槐花、桔梗、蒲公英、北沙参、柴胡(北)、女贞子、茵陈、苦杏仁、葛根、艾叶、木香、白芷、杜仲、鸡血藤、延胡索、枳实、槟榔、荆芥、莪术、淡竹叶、防风、栀子、猪苓、牛膝、广藿香、肉苁蓉、补骨脂、巴戟天、醋香附、熟地黄、牡丹皮。

1.1.3 试剂与仪器 水解酪蛋白(M-H)平板(法国梅里埃公司)、血平板(法国梅里埃公司)、水解酪蛋白(M-H)肉汤(江门凯林公司)、药敏纸片(英国Oxoid公司)、Costar 96孔板(美国康宁公司)、pH计(美国赛默飞公司)、VITEK 2全自动药敏分析仪及配套检测试剂(法国梅里埃公司)、VITEK MS质谱仪及配套检测试剂(法国梅里埃公司)、碱性磷酸酶检测试剂盒(美国强生公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 泛耐药菌株鉴定及确认 将收集的28株实验菌株复苏后,用VITEK MS质谱仪鉴定。质谱鉴定质控菌株为大肠埃希菌 ATCC8739。对鉴定结果

为肺炎克雷伯菌的每一株菌,同时采用VITEK 2全自动药敏分析仪和纸片扩散(K-B)法进行药敏实验,确认其是否为泛耐药菌株。药敏实验质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922,检测药物包括:结果判断标准参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)抗菌药物敏感实验操作指南(2019版)^[4]。

1.2.2 中药药液配制 根据各自相当于原药的重量,取相对应重量的中药配方颗粒,将60种药物均溶解成相当于原药浓度1 g/mL的药液。所有药液经121℃、高压灭菌5 min后,保存于4℃待用。

1.2.3 抑菌活性药物筛选 将复苏后的所有泛耐药菌株,分别配制成0.5麦氏浓度的菌悬液,涂布于M-H平板上。采用琼脂打孔法,用6 mm的打孔器在涂布有菌液的平板上打孔,加入200 μL的待筛选药液,37℃孵育18 h。根据抑菌圈直径大小判断抑菌效果,判断标准^[2]为:抑菌圈直径<10 mm,无抑菌作用;10~14 mm,弱抑菌作用;15~19 mm,中等抑菌作用;>20 mm,强抑菌作用。

1.2.4 不同pH药液抑菌活性比较 用pH计测定上述有抑菌活性的药液pH值,并用1 mol/L的NaOH溶液将其调节至中性。参照1.2.3的操作步骤,以1 mol/L的NaOH溶液为对照,测定中性药液的抑菌圈直径。分别比较同一药物的两种不同pH药液抑菌效果的差异。

1.2.5 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)测定 参照《抗菌药物敏感性试验的技术要求》(WS/T639-2018)中的药敏试验方法,采用宏量肉汤稀释法,检测有抑菌作用中药的MIC和MBC。进行实验的11个药物浓度梯度从高到底依次为:1 024、512、256、128、64、32、16、8、4、2和1 mg/mL(由于预实验发现有抑菌作用的中药配方颗粒,在相当于原药浓度为1 mg/mL均无抑菌活性,而浓度为1 g/mL时均有抑菌作用,故选择1~1 024 mg/mL浓度药物范围进行试验)。以抑制细菌肉眼可见生长的最低浓度为MIC。将高于MIC的连续3个稀释度的混合液,分别取100 μL转种到血平板上,37℃孵育箱中孵育18 h,与生长对照管相比杀灭99.9%以上细菌生长的最低浓度为MBC。所有具有抑菌作用药物的MIC和MBC均按照以上方法测定。

1.2.6 联合药敏实验 采用棋盘稀释法,检测有抑菌作用中药的两两联合的抑菌效果。两种药物分别标记为甲和乙,操作步骤:(1)根据甲和乙的MIC分别制备1/2MIC、1MIC、2MIC、4MIC、8MIC浓度的药液;(2)向96孔板的横向6行(A-F行)各孔,从左

到右依次加入 M-H 肉汤、1/2MIC、1MIC、2MIC、4MIC、8MIC 浓度的甲药液 50 μL ; (3) 同样向纵向 6 行(1~6 行)各孔,从上到下加入 M-H 肉汤和各浓度的乙药液; (4) 配制菌量约为 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液,取 100 μL 加入各孔。此时,每孔的甲和乙的药物浓度均为原药物浓度的 1/4,菌液浓度约为 5×10^5 CFU/mL; (5) 震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 18 h 后观察结果。实验结果以分级抑菌浓度 (fractional inhibitory concentration, FIC) 指数作为判断联合药敏实验的依据。FIC 指数计算公式: $\text{FIC} = \text{甲联用 MIC} / \text{甲单独 MIC} + \text{乙联用 MIC} / \text{乙单独 MIC}$; $\text{FIC} \leq 0.5$ 为协同作用; $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ 为相加作用; $1 < \text{FIC} \leq 2$ 为无关作用; > 2 为拮抗作用^[5]。

1.2.7 细菌细胞外酶活性测定 取 1.2.5 中 11 个浓度梯度的培养液和生长对照管的培养液各 1 mL, 分别 12 000 r/min, 离心 5 min, 取上清液, 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 待用。对仪器校准并且质控在控的情况下, 用多点速率法检测各药物浓度的药液作用后的细菌细胞外液中碱性磷酸酶 (ALP) 的活性浓度。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 Wilcoxon 符号秩检验。

2 结果

2.1 泛耐药菌株鉴定及确认 收集的 28 株细菌, 经 VITEK MS 鉴定结果均为肺炎克雷伯菌。两种药敏实验结果一致, 28 株细菌均为泛耐药菌株。

2.2 抑菌活性药物筛选 本次共筛选出黄芩、黄连、麻黄和鸡血藤 4 种对所有泛耐药菌均有抑菌活性的中药颗粒剂, 以及夏枯草和地榆 2 种对部分菌株有抑菌活性的中药颗粒剂。结果显示, 黄芩有强抑菌作用; 黄连有中等抑菌作用; 麻黄和鸡血藤有弱抑菌作用 (见表 1)。

2.3 不同 pH 药液抑菌活性比较 4 种对 28 株泛耐药菌株均有抑菌活性的中药颗粒剂调整 pH 前后, 抗菌活性差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。

2.4 MIC 和 MBC 黄芩、麻黄和鸡血藤等 3 种对泛耐药菌均有抑菌作用的中药, 其 MIC 依次为: 64、128、256 mg/mL; MBC 依次为: 128、256、512 mg/mL。82.1% (23/28) 实验菌株黄连的 MIC 为 64 mg/mL, 17.9% (5/28) 为 128 mg/mL; 28.6% (8/28) 实验菌株黄连的 MBC 为 64 mg/mL, 71.4% (20/28) 为 128 mg/mL。

2.5 联合药敏实验 结果显示, 除黄芩和黄连表现

出拮抗作用之外, 其他两两联合药敏实验结果均表现出无关作用 ($1 < \text{FIC} \leq 2$), 黄芩和黄连联合药敏实验结果见表 3。

表 1 6 种有抑菌活性中药颗粒剂对泛耐药肺炎克雷伯菌的抑菌效果

中药	抑菌圈直径 * /mm	最小抑菌圈直径/mm	最大抑菌圈直径/mm
黄芩	20(20,21)	19	23
黄连	15(15,16)	14	18
麻黄	12(11,13)	11	14
鸡血藤	10(10,11)	10	12
夏枯草	7(6,9)	6	13
地榆	8(7,9)	7	12

* 示各组药物的抑菌圈直径均不服从正态分布, 故用中位数 (四分位数间距) 表示

表 2 4 种有抑菌作用的中药调节 pH 前后抑菌活性比较

中药	调节 pH 前药液		调节 pH 后药液		u_c	P^{**}
	药液 pH 值	抑菌圈直径/mm	药液 pH 值	抑菌圈直径/mm		
黄芩	5.252	20(20,21)	7.302	20(20,21)	-0.76	>0.05
黄连	4.782	15(15,16)	7.189	16(15,16)	-1.41	>0.05
麻黄	5.071	12(11,13)	7.134	12(11,12)	-1.71	>0.05
鸡血藤	5.162	10(10,11)	7.273	10(10,11)	-0.43	>0.05

注: 调节 pH 前后各种药物的抑菌圈直径数据均不服从正态分布, 故用中位数 (四分位数间距) 表示; * 示同一种药物调节 pH 前后 2 种药液对 28 株泛耐药菌抑菌圈直径的差异比较, 采用 Wilcoxon 符号秩检验

表 3 黄芩和黄连联合使用对泛耐药肺炎克雷伯菌的抑菌效果

菌株数 (n=28)	单独用药 MIC 值/(mg/mL)		联合用药 MIC 值/(mg/mL)		FIC 指数	抑菌效果
	黄芩	黄连	黄芩	黄连		
4	64	64	128	128	4.0	拮抗作用
18	64	64	64	128	3.0	拮抗作用
1	64	64	32	128	2.5	拮抗作用
5	64	128	64	256	3.0	拮抗作用

2.6 细菌细胞外 ALP 的活性 4 种中药随着浓度变化, 其细菌细胞外 ALP 的变化见表 4。与对照组相比, 低浓度的黄芩 (1 mg/mL) 和黄连 (2 mg/mL) 作用后, 细菌细胞外 ALP 有明显变化 ($P < 0.01$); 而低浓度的鸡血藤 (≤ 16 mg/mL) 和麻黄 (≤ 16 mg/mL) 作用后, 细菌细胞外 ALP 均无明显变化 ($P > 0.05$)。随着药物浓度的增加, ALP 的活性均升高, 这种变化在黄芩和黄连作用后更加明显。当药物浓度均达到各自的 MBC 时, 鸡血藤和麻黄组的 ALP 活性明显低于黄芩和黄连组。这说明, 黄芩和黄连对于泛耐药肺炎克雷伯菌细胞膜的通透性有较大改变, 而鸡血藤和麻黄对其通透性的改变较小。

表4 不同浓度的4种中药作用后细菌细胞外ALP浓度变化

中药浓度/ (mg/mL)	细菌细胞外ALP浓度/(U/mL)			
	黄芩(n=28)	黄连(n=28)	鸡血藤(n=28)	麻黄(n=28)
阴性对照	5.82±1.93	5.54±1.95	5.43±1.62	5.61±1.97
1	8.18±3.30	8.68±1.93	7.79±2.54▲▲	7.25±1.88##
2	34.57±5.89**	16.36±2.42	7.46±2.49##	7.85±2.34##
4	65.43±9.52**	33.25±5.04△△	8.11±2.47##	7.04±2.20##
8	117.57±8.78**	60.57±7.05△△	7.50±2.46##	7.39±2.04##
16	203.71±13.92**	103.29±11.59△△	9.57±2.44	7.93±1.90
32	357.57±15.09**	187.71±16.69△△	25.96±5.28##	15.89±3.20##
64	642.18±21.26**	424.61±20.77△△	59.64±8.06##	35.18±5.30##
128	1052.96±30.82**	825.64±24.51△△	129.68±11.05##	72.64±9.29##
256	2542.39±36.89**	1805.75±52.08△△	286.36±15.86##	181.96±17.02##
512	4734.93±46.88**	248.29±30.12△△	575.71±22.74##	506.07±22.55##
F	120 622.53	100 445.55	9 699.11	7 466.34
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	508.919	468.428	92.427	86.205

组间两两比较 **P<0.01; △△P<0.01; ▲▲P<0.01; ##P<0.01

3 讨论

泛耐药肺炎克雷伯菌引起的感染,依靠目前临床常用的抗生素治疗,感染难以控制^[6]。而新抗生素的研发成功率低、周期长、成本昂贵,在短时间内依靠抗生素的升级换代也难以解决泛耐药菌株引起的感染问题。研究^[2,7-8]表明,多种中药具有良好的抑菌作用。由于中草药具有不良反应少以及耐药性危害低等优点,且部分具有抗菌活性的中药还能够增强机体免疫系统抗病能力^[2],因此,从中药中筛选泛耐药菌株的抑制剂,对泛耐药菌株引起感染的控制具有广泛的前景。

本研究中的60种中药颗粒剂,除6种对所有菌株或部分菌株具有抗菌活性的中药外,其他中药对所有泛耐药肺炎克雷伯菌均无抗菌活性。这些无抗菌活性的中药中,如广藿香^[7]、板蓝根^[9]、乌梅^[9]、金银花^[9-10]和赤芍^[10]等,对部分其他细菌具有良好的抑菌活性。这说明不同细菌对同一中药的敏感性不同。大多数细菌生长的最适pH值为7.2~7.6,一般而言,酸性环境和强碱性环境均会抑制细菌生长^[11]。本研究筛出的4种对所有泛耐药菌株均有抑菌活性的中药,其水溶液均为弱酸性,但调整pH后,其抑菌活性并无明显改变。这表明对于泛耐药的肺炎克雷伯菌,这些中药水溶液自身的弱酸性环境,对其抑菌效果无影响。4种中药颗粒剂MIC

值和MBC值显示,黄芩的抑菌效果最强,黄连次之,麻黄和鸡血藤的抑菌效果相对较弱,这和琼脂打孔法的结果相一致。黄芩、黄连和麻黄的抗菌谱较广,对多种细菌均有不同程度的抑菌作用^[12]。鸡血藤的主要药理作用^[13]是调节脂代谢、降压、抗癌等作用,而抗菌活性鲜有报道,但本研究表明,鸡血藤对于泛耐药肺炎克雷伯菌具有一定抗菌作用。殷姿等^[14]研究表明,黄芩对肺炎克雷伯菌NTUH-K2044也具有抗菌作用,但其MIC值(32 mg/mL)和MBC值(64 mg/mL)均低于本研究的结果。这可能与不同来源的菌株有关。中医认为^[15]黄芩和黄连性味苦、寒,清热燥湿、泻火解毒,常同类相须配伍,起协同作用^[16]。但本研究表明,两者联合应用体外药敏实验,出现拮抗作用。任书青等^[16]发现黄芩和黄连联合应用对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体外抗菌活性,出现本研究类似的结果。因此,两者若需配伍用于抗感染治疗时,最好分别煎制并且分开服用^[16]。目前,中药直接抗菌作用的具体机制尚不明确^[3],目前的研究结果主要归为4类^[3,12]:使细胞膜的通透性改变;抑制细菌体内酶的活性,从而干扰其新陈代谢;抑制蛋白质和核酸的合成;氧化细菌体内活性基团。本研究通过药物作用后细菌细胞外ALP的活性变化,说明了黄芩和黄连对泛耐药肺炎克雷伯菌的细胞膜通透性改变远大于鸡血藤和麻黄的作用,这表明:(1)黄芩和黄连抗菌作用机制与其增加细胞膜的通透性有关;(2)鸡血藤和麻黄抗菌活性可能是其他机制发挥主要作用。

综上所述,黄芩、黄连、鸡血藤和麻黄对于泛耐药肺炎克雷伯菌均具有抗菌活性,其中黄芩和黄连的抗菌机制可能与改变细菌细胞膜的通透性有较大关系,鸡血藤和麻黄可能存在其他主要抗菌机制,但这4种中药的具体抗菌机制需要进一步研究。此外,黄芩和黄连配伍用于抗菌治疗时,不建议同时煎服。

[参考文献]

- [1] OLIVA A, MASCELLINO MT, CIPOLLA A, et al. Therapeutic strategy for pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* severe infections; short-course treatment with colistin increases the *in vivo* and *in vitro* activity of double carbapenem regimen[J]. Int J Infect Dis, 2015, 33: 132.
- [2] 华亚南, 陈辉, 张其中. 100种中草药水提物体外抑杀无乳链球菌的药效研究[J]. 生态科学, 2015, 34(3): 26.
- [3] 吴峥嵘. 双黄连粉针剂对多重耐药大肠埃希菌耐药性影响的机理研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.

(下转第522页)