

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.09.005

## 鱼腥草素钠联合阿米卡星体外抗多重耐药鲍曼不动杆菌的作用分析\*

毛建梅<sup>1</sup>, 周孟杰<sup>1</sup>, 蔡燕<sup>2△</sup>

1. 川北医学院临床检验医学系, 四川南充 637007; 2. 川北医学院附属医院产前诊断中心, 四川南充 637000

**摘要:**目的 探讨鱼腥草素钠(SH)联合阿米卡星(AMK)对多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)的体外抑制作用。方法 从川北医学院附属医院微生物室收集 10 株 MDR-AB 菌株,采用棋盘法设计实验,以微量肉汤稀释法、琼脂稀释法分别测定两种药物不同水平组合对 MDR-AB 的最低抑菌浓度(MIC)值,计算部分抑菌浓度指数(FICI)及抑制率,判断两者的联合抗菌效果。结果 两种方法测得 SH、AMK 联用时的 FICI 值为  $>0.5 \sim 1.0$ ,表现出“相加”作用。与单用 AMK 相比,SH 与 AMK( $<1\ 024\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )联用时的抑制率降低( $P < 0.05$ ),SH 与 AMK( $\geq 1\ 024\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )联用时的抑制率升高( $P < 0.05$ )。结论 SH 能够在体外抑制 MDR-AB,与单用 AMK 比较,联用后随着 AMK 水平的升高对细菌的抑制作用先降低后升高。

**关键词:**鱼腥草素钠; 阿米卡星; 鲍曼不动杆菌; 部分抑菌浓度指数

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)09-1199-04

**Analysis on role of sodium houttuynia combined with amikacin against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in vitro\***

MAO Jianmei<sup>1</sup>, ZHOU Mengjie<sup>1</sup>, CAI Yan<sup>2△</sup>

1. Faculty of Clinical Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637007, China; 2. Prenatal Diagnosis Center, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China

**Abstract: Objective** To discuss the in vitro inhibitory effect of sodium houttuynia (SH) combined with amikacin (AMK) on multidrug-resistant Acinetobacter baumannii (MDR-AB). **Methods** Ten strains of MDR-AB were collected from the microbiology laboratory of Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College. The chessboard method was adopted to design the experiment, the microdilution broth method and agar dilution method were used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) value for different concentrations of SH and AMK combination against MDR-AB, the fractional inhibitory concentration (FICI) index and inhibition rate were calculated to judge the effect of their combination against the bacteria. **Results** The FICI value of SH and AMK combination by using the two methods was  $>0.5 \sim 1.0$ , showing the additive effect. Compared with using AMK alone, the inhibition rate of SH combined with AMK ( $<1\ 024\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) was decreased ( $P < 0.05$ ), while which of SH combined with AMK ( $\geq 1\ 024\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) was increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SH can inhibit MDR-AB in vitro, and after its combination with AMK, its inhibitory effect on bacteria is decreased first and then increased with the increase of AMK concentration compared with using AMK alone.

**Key words:** sodium houttuynia; amikacin; Acinetobacter baumannii; fractional inhibitory concentration

鲍曼不动杆菌是导致医院内感染的常见革兰阴性杆菌,其感染多发于重症监护室和神经外科,以下呼吸道分泌物检出率最高。有研究报道,多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)、耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CR-AB)的检出率超过 60.00%,并且全耐药鲍曼不动杆菌(PDR-AB)检出率达 16.67%<sup>[1]</sup>。随着经验性

抗菌药物的使用,MDR-AB 对临床上常用的抗菌药物,如青霉素类、 $\beta$ -内酰胺类、碳青霉烯类、喹诺酮类药物的耐药率为 90.00%以上,对易导致不良反应的氨基糖苷类抗菌药物的耐药率为 54.50%<sup>[2]</sup>。近年来,随着人们在中药抗菌方面的研究不断深入,具有抗菌活性的中药逐渐被报道,比如鱼腥草的活性成分鱼腥

\* 基金项目:四川省卫生健康委员会 2020 普及应用项目(20PJ145)。

作者简介:毛建梅,女,在读硕士,主要从事中药抗菌的机制研究。△ 通讯作者, E-mail: caiyandd@nsmc.edu.cn。

本文引用格式:毛建梅,周孟杰,蔡燕. 鱼腥草素钠联合阿米卡星体外抗多重耐药鲍曼不动杆菌的作用分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(9): 1199-1202.

草素钠(SH)已被证实对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌及结核分枝杆菌都有一定的抗菌作用,并且能增强阿奇霉素、氟康唑、红霉素的抗菌活性<sup>[3-7]</sup>。本课题组前期预实验发现,SH 对 MDR-AB 有一定的抑制作用,因此,本研究将在体外探讨 SH 与阿米卡星(AMK)是否具有联合抗菌作用,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本实验所采用的 10 株 MDR-AB 菌株收集于川北医学院附属医院微生物室,其中 6 株来源于神经外科,4 株来源于重症监护室,均为痰液标本。

**1.2 仪器与试剂** 仪器:VITEK2 全自动微生物分析仪及 AST-GN 鉴定卡(法国生物梅里埃有限公司),AST-GN16 药敏卡及配套药敏纸片,台式恒温振荡器(上海跃进医疗),DHP420 电热恒温培养箱(重庆永恒实验仪器厂),TECAN 全波长全自动酶标仪(型号 M200PR0)。试剂及药品:SH(10 克/瓶,购自西安开来生物工程有限公司),AMK 注射液(0.2 克/支,川北医学院附属医院药房提供),四甲基偶氮唑盐(MTT,广州赛国生物科技有限公司),二甲基亚砜(DMSO,成都市科龙化工试剂厂)。培养基:水解酪蛋白(MH)肉汤培养基(海博生物技术有限公司),MH 琼脂培养基(海博生物技术有限公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 菌株筛选** 采用 VITEK2 全自动微生物分析仪及 AST-GN 鉴定卡进行细菌鉴定,采用 AST-GN16 药敏卡及配套药敏纸片进行药敏试验。根据上述鉴定结果选择 10 株对 3 类及以上抗菌药物(包括 AMK、环丙沙星、亚胺培南、青霉素、头孢他啶等)耐药的鲍曼不动杆菌。以 ATCC19606 作为质控菌株。

**1.3.2 细菌复苏及菌液稀释** 将收集的 10 株 MDR-AB 菌株用 30%甘油保存于 -80 °C 冰箱中。实验时取 2 μL 保存菌液接种于 1 mL 灭菌的 MH 肉汤培养基中,放置于 37 °C 恒温振荡器中培养过夜。次日观察到 MH 肉汤培养基出现浑浊后,8 000 r/min 离心 3 min 后倒掉上清液,加入 1 mL 的生理盐水重悬细菌,用生理盐水将菌液调成 570 nm 处吸光度值(A 值)为 1.0(相当于 0.5 麦氏浊度,1×10<sup>8</sup> cfu/mL)后再稀释 1 000 倍备用。

**1.3.3 单用 SH、AMK 的最低抑菌浓度(MIC)值测定** (1)微量肉汤稀释法:称取 SH 粉末,用 MH 肉汤配制为不同水平的 SH 溶液(4 500、4 000、3 500、3 000、2 500、2 000、1 500、1 000、500 μg/mL),各取 80 μL 依次加入 96 孔板中。AMK 原液 100 mg/mL,用 MH 肉汤配制为不同水平的 AMK 溶液(81 920、40 960、20 480、10 240、5 120、2 560、1 280、640 μg/mL),各取 10 μL 依次加入 96 孔板中。各对应孔中加入 10 μL 菌液,用 MH 补足至 100 μL。每个水

平梯度均做 3 个孔,同时设置药物对照孔(不加细菌)、阳性对照孔(不加药物)、阴性对照孔(只加 MH 培养基)。接种完后将 96 孔板置于 37 °C 台式恒温振荡器中培养 8 h 后观察细菌生长情况,当阳性对照孔细菌生长且药物对照孔和阴性对照孔均无菌生长时,每孔加入 10 μL 的 MTT(用无菌磷酸盐缓冲液配制,水平为 5 mg/mL),再次置于 37 °C 台式恒温振荡器中培养 1 h,肉眼观察培养孔中的颜色,黑色代表孔内有菌落,以无细菌生长的最低浓度作为该药物的 MIC 值。接着每孔加入 100 μL 的二甲基亚砜(DMSO),振荡摇匀 10 min,用酶标仪检测 490 nm 处的 A 值并计算出各水平梯度的平均抑制率。(2)琼脂稀释法:SH 琼脂平板的终水平同微量肉汤稀释法一致,取 9 支无菌试管,分别称取 SH 粉末溶于 10 mL 灭菌 MH 琼脂中,混匀并倒置平板冷却备用。取 9 支无菌试管依次加入 AMK 原液(100 mg/mL)1 638.4、819.2、409.6、204.8、102.4、51.2、25.6、12.8、6.4 μL,用灭菌 MH 琼脂补齐至 10 mL,混匀后倒置平板备用。取 2 μL 稀释好的菌液依次点种于各琼脂平板上,每株菌在各平板上接种 2 个点,37 °C 电热恒温培养箱中培养 8 h 后观察细菌生长情况,并在菌落中滴加 5 μL 的 MTT 以读取该药物的 MIC 值。所有实验均重复 3 次。

**1.3.4 SH 与 AMK 联用的 MIC 值测定** (1)微量肉汤稀释法:根据单药测得的 MIC 值,SH 以 2 倍 MIC、AMK 以 1 倍 MIC 为最高浓度,分别按倍比稀释配制 6 个系列水平。取无菌的 96 孔板,按棋盘法设计将药物两两组合加入各孔中(SH 80 μL、AMK 10 μL),再加入 10 μL 菌液,并用 MH 肉汤补足至 100 μL。(2)琼脂稀释法:根据单药的 MIC 值,SH 水平梯度设为 MIC、1/2MIC、1/4MIC、0,AMK 水平梯度设为 MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC、1/16MIC、1/32MIC、0,分别配制两种药物各水平组合共 28 个琼脂平板。其余操作方法同 1.3.3,所有实验均重复 3 次。分别记录最佳组合效应时两种药物联用时的各自的 MIC 值及两种药物单用时的 MIC 值。计算出部分抑菌浓度指数(FICI) = MIC<sub>SH联合</sub>/MIC<sub>SH单用</sub> + MIC<sub>AMK联合</sub>/MIC<sub>AMK单用</sub>。判读标准:FICI ≤ 0.5 为协同作用;0.5 < FICI ≤ 1.0 为相加作用;1.0 < FICI ≤ 2.0 为无关作用;FICI > 2.0 为拮抗作用<sup>[8]</sup>。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 单用 SH、AMK 的 MIC 值** 微量肉汤稀释法:10 株 MDR-AB 及质控菌株单用 SH 的 MIC 值为 1 200~2 800 μg/mL,单用 AMK 的 MIC 值为 8 192 μg/mL。琼脂稀释法:10 株 MDR-AB 及质控菌株单用 SH 的 MIC 值为 2 400 μg/mL,单用 AMK 的 MIC

值为 16 384  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。见表 1。

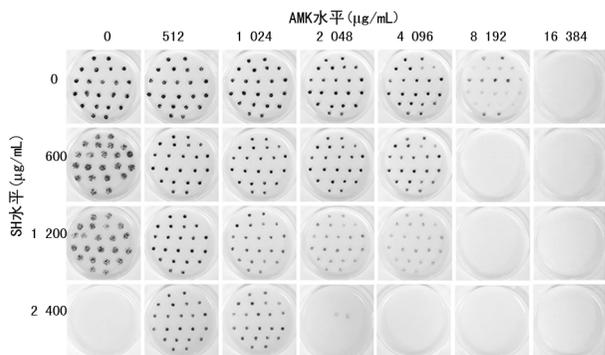
**2.2 SH 与 AMK 联用的 MIC 值** 结果显示,SH 与 AMK 联用后 AMK 的 MIC 值降低至单用时的 1/2, FICI 值均处于  $>0.5 \sim 1.0$ , 表现出“相加”的抗菌作用。见表 1。当 SH (MIC) 单用时无细菌生长, 与 AMK 联用时可见细菌生长, 表明 SH 与 AMK 联用后可能存在促进细菌生长的作用。见图 1、2。此外, 根

据酶标仪所测得 SH(1/2 MIC) 与 AMK 系列水平联用后的 A 值计算出 10 株菌的平均抑制率, 结果显示, 与单用 AMK 相比, SH 与 AMK ( $<1\ 024\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联用时的抑制率降低, SH 与 AMK ( $\geq 1\ 024\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联用时抑制率升高, 且两者的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 SH、AMK 单用及联用时检测 MDR-AB 的 MIC 值和 FICI 值

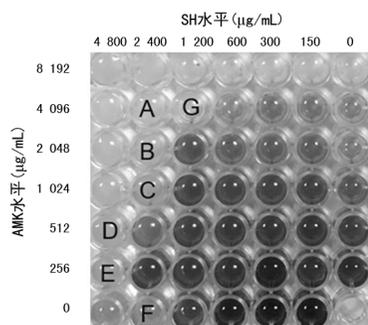
菌株编号	MIC <sub>微量肉汤稀释法</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			FICI	MIC <sub>琼脂稀释法</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			FICI
	SH <sub>单用</sub>	AMK <sub>单用</sub>	SH <sub>联合</sub> /AMK <sub>联合</sub>		SH <sub>单用</sub>	AMK <sub>单用</sub>	SH <sub>联合</sub> /AMK <sub>联合</sub>	
1	2 400	8 192	1 200/4 096	1.00	2 400	16 384	600/8 192	0.75
2	2 400	8 192	1 200/4 096	1.00	2 400	16 384	600/8 192	0.75
3	2 800	8 192	1 400/4 096	1.00	2 400	16 384	600/8 192	0.75
4	1 200	8 192	600/4 096	1.00	2 400	16 384	600/8 192	0.75
5	2 800	8 192	1 400/4 096	1.00	2 400	16 384	600/8 192	0.75
6	2 800	8 192	700/4 096	0.75	2 400	16 384	600/8 192	0.75
7	2 800	8 192	700/4 096	0.75	2 400	16 384	600/8 192	0.75
8	2 800	8 192	700/4 096	0.75	2 400	16 384	600/8 192	0.75
9	2 400	8 192	1 200/4 096	1.00	2 400	16 384	600/8 192	0.75
10	2 400	8 192	1 200/4 096	1.00	2 400	16 384	600/8 192	0.75
ATCC19606	2 800	8 192	1 400/4 096	1.00	2 400	16 384	600/8 192	0.75

注:SH<sub>联合</sub>/AMK<sub>联合</sub>表示 SH 与 AMK 联用时 SH 与 AMK 各自的 MIC 值。



注:黑色代表有菌落生长。

图 1 琼脂稀释法检测 SH 与 AMK 联用的药敏试验结果



注:A、B、C、D、E、F、G 均未见细菌生长, G 为最佳抑菌浓度组合,  $FICI=1/2+1/2=1$ 。

图 2 微量肉汤稀释法检测 SH 与 AMK 联用的部分药敏试验结果

表 2 不同水平 AMK 单用及与 SH(1/2 MIC) 联用时的平均抑制率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

AMK 水平 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	AMK 单用	AMK 与 SH 联用	t	P
4 096	87.70 $\pm$ 2.00	96.22 $\pm$ 1.02	11.99	<0.001
2 048	79.83 $\pm$ 2.86	88.25 $\pm$ 2.23	7.33	<0.001
1 024	71.34 $\pm$ 4.12	77.87 $\pm$ 4.68	3.31	0.004
512	66.37 $\pm$ 4.00	61.56 $\pm$ 4.70	-2.46	0.024
256	54.98 $\pm$ 5.76	45.50 $\pm$ 6.02	-3.60	0.004

### 3 讨 论

鲍曼不动杆菌是导致医院内感染的主要革兰阴性杆菌之一, 可能与患者住院时间长、接受侵入性操作及使用广谱抗菌药物有关。有关共识指出, 针对 MDR-AB 感染可选用头孢哌酮/舒巴坦、氨苄西林/舒巴坦、碳青霉烯类抗菌药物, 同时联合氨基糖苷类或喹诺酮类抗菌药物进行治疗<sup>[9]</sup>。随着 MDR-AB、CR-AB 的检出率逐渐升高, 且对常用抗菌药物呈高度耐药性, 多种药物的联用为鲍曼不动杆菌的治疗提供了新方案。AMK 作为一种新型半合成氨基糖苷类抗菌药物, 常用于鲍曼不动杆菌的治疗, 当与其他抗菌药物, 如替加环素、头孢哌酮钠/舒巴坦联用后的治疗效果更佳<sup>[2,10]</sup>。

近年来, 相关研究发现 SH 对金黄色葡萄球菌、

铜绿假单胞菌、白色念珠菌等都具有一定的抑菌作用<sup>[5-7]</sup>,但对鲍曼不动杆菌是否具有抑菌作用少有报道。本研究中 10 株 MDR-AB 对 SH 的 MIC 值为 1 200~2 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,表明 SH 能够在体外抑制 MDR-AB,但是其单独使用的抗菌活性相对较低。MDR-AB 对 AMK 也表现出较高的耐药性,与 KUTI 等<sup>[11]</sup>报道的结果一致,可见单用 AMK 对 MDR-AB 的治疗效果欠佳。因此,本研究进一步探讨 SH 能否增强 AMK 的抗菌作用,实验结果表明,当 SH 与 AMK 联用后表现出“相加”的抗菌作用。值得注意的是,从表 2 中可见 SH 与 AMK( $<1\ 024\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )联用时的抑制率低于单用 AMK,表明两种药物联用后可能存在促进细菌生长的作用,导致上述现象的原因值得进一步探讨。

鲍曼不动杆菌对 AMK 的耐药机制包含以下几点:(1)鲍曼不动杆菌产生氨基糖苷类修饰酶(A-MEs),编码的相关基因大多位于质粒转座子上,导致耐药基因在细菌间传播,并通过上述酶修饰、改变氨基糖苷类抗菌药物的活性,此为最主要的耐药机制;(2)产生 16S rRNA 甲基化酶,能够使细菌的 30S rRNA 亚单位上的 16S rRNA 位点甲基化,从而改变氨基糖苷类抗菌药物的作用靶点;(3)外排泵作用,通过促进药物外排来降低细胞内氨基糖苷类抗菌药物的浓度;(4)影响细菌细胞膜,即通过减少脂多糖所带的负电荷和下调孔蛋白的表达来阻止药物进入细胞<sup>[12]</sup>。目前报道 SH 主要是通过抑制细菌生物被膜的形成来达到抗菌作用<sup>[3-4]</sup>,但是较少见 AMK 影响细菌生物被膜的相关报道。AMK 因使用剂量不同而表现出不同的耐药机制的相关报道较少。本研究中,与单用 AMK 比较,SH 与 AMK 联用后的抑制率先降低后升高的具体机制仍不清楚,笔者认为 SH 可能通过抑制细菌生物被膜、氨基糖苷类修饰酶、16S rRNA 甲基化酶、外排泵的表达来达到抗菌作用。因此,后续研究将进一步对其抗菌机制深入探讨。

综上所述,SH 能够在体外抑制 MDR-AB,与单用 AMK 相比,联用后随着 AMK 水平的升高其抗菌作用先降低后升高。因此,建议使用 AMK 治疗的患者应合理选择食用鱼腥草及相关制剂。

## 参考文献

[1] 严立,孙继德,王訔.某教学医院 2015—2018 年神经外科

病房细菌耐药性监测[J].中国抗生素杂志,2020,45(7):679-685.

- [2] 李丹.头孢哌酮/舒巴坦联合阿米卡星对多重耐药鲍曼不动杆菌的疗效分析[J].中外医疗,2016,35(23):130-133.
- [3] WANG T, HUANG W, DUAN Q, et al. Sodium houuttuyfonate in vitro inhibits biofilm dispersion and expression of *bdIA* in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Mol Biol Rep, 2019,46(1):471-477.
- [4] 濮燕屏,程惠娟,段强军,等.鱼腥草素钠联合阿奇霉素对金黄色葡萄球菌生物被膜早期黏附的影响[J].中成药,2015,37(8):1813-1817.
- [5] SHAO J, CUI Y, ZHANG M, et al. Synergistic in vitro activity of sodium houuttuyfonate with fluconazole against clinical *Candida albicans* strains under planktonic growing conditions[J]. Pharm Biol, 2017,55(1):355-359.
- [6] 李丹.鱼腥草有效成分及抗结核作用研究进展[J].河南中医,2020,40(2):299-303.
- [7] 官妍,许甘霁.鱼腥草素钠及与红霉素联用对产膜表皮葡萄球菌 *lrgB* 的影响[J].生物学杂志,2020,37(2):41-45.
- [8] HUANG Y, ZHOU Q, WANG W, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: clinical efficacy of combined antimicrobial therapy and in vitro drug sensitivity test results[J]. Front Pharmacol, 2019,13(10):92.
- [9] 周华,周建英,俞云松.中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识解读[J].中国循证医学杂志,2016,16(1):26-29.
- [10] 郭利敏,郭珊,曹献芹,等.替加环素、环丙沙星、阿米卡星三联对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的抑菌效果观察[J].中国医院药学杂志,2019,39(4):365-368.
- [11] KUTI J L, WANG Q, CHEN H, et al. Defining the potency of amikacin against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* derived from Chinese hospitals using CLSI and inhalation-based breakpoints [J]. Infect Drug Resist, 2018,25(11):783-790.
- [12] SHEIKHALIZADEH V, HASANI A, AHANGARZADEH R M, et al. Comprehensive study to investigate the role of various aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Infect Chemother, 2017,23(2):74-79.

(收稿日期:2020-08-16 修回日期:2020-12-22)