文章编号:1000-5404(2009)19-1887-03

论著

山楂活性组分与β-内酰胺类抗生素的联合抑菌作用

姜 珂[1],覃容欣[2],朱仝飞[1],周 红[2],郑 江[1] (第三军医大学:[1]西南医院综合实验研究中心,[2]医学检验系暨药学院药理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究山楂提取物与β-内酰胺类抗生素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant staphylococcus aureus*, MRSA)的体外联合抗菌作用。**方法** 干燥山楂去核切片75%乙醇提取,依次经乙酸乙酯、正丁醇萃取,取正丁醇层经D-101大孔树脂、硅胶柱色谱分离得到组分CP,体外药敏试验验证其联合4种β-内酰胺类抗生素(苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉)抑制MRSA的作用。**结果** 单独应用苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉及组分CP对实验株MRSA的最低抑菌浓度(MIC)分别为256、512、512、128、1 024 μg/ml;联合用药时,亚MIC浓度的组分CP(128 μg/ml)使苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉MIC分别降低至2、32、16、2 μg/ml,部分抑菌指数(FIC)分别为0.13、0.16、0.19、0.14,均小于0.5。**结论** 山楂活性组分CP与β-内酰胺类抗生素具有显著的体外协同抑制MRSA的作用。

关键词: 山楂;β-内酰胺类抗生素;最低抑菌浓度;部分抑菌指数;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
中图法分类号: R285.5; R695; R978.11 **文献标识码:** A

Antibacterial activity of active component of *Crataegus pinnatifida* combined with β-Lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro*

JIANG Ke[1], QIN Rong-xin[2], ZHU Tong-fei[1], ZHOU Hong[2], ZHENG Jiang[1] ([1]Medical Research Center, Southwestern Hospital, [2]Department of Pharmacology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the *in vitro* antibacterial activities of the *Crataegus pinnatifida* (*C. p*) extracts in combination with 4 kinds of β-lactams antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** The dried fruits of *C. p* were extracted with 75% EtOH followed by being extracted successively with EtOAc and n-BuOH, then the obtained n-BuOH layer was subjected to macroporous D-101 and then to silica gel column chromatography. Finally we obtained the active component of *C. p* (CP), and validate the *in vitro* antibacterial activities of the component CP in combination with 4 kinds of β-lactams antibiotics against MRSA. **Results** The minimal inhibitory concentration (MIC) of Oxacillin, Ampicillin sodium-sulbactam sodium, Ampicillin, Cephazolin and CP component were 256, 512, 512, 128 and 1 024 μg/ml, However, when combined with the *C. p* component at its sub-MIC (128 μg/ml), the MIC of the above 4 kinds of β-lactams antibiotics was as lower as 2, 32, 16 and 2 μg/ml respectively. The fractional inhibitory concentration (FIC) of them were 0.13, 0.19, 0.16 and 0.14, respectively. **Conclusion** *C. p* component has synergistic antibacterial effect on MRSA when combined with β-lactams antibiotics.

Key words: *Crataegus pinnatifida*; β-lactams antibiotics; minimal inhibitory concentration; fractional inhibitory concentration; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant staphylococcus aureus*, MRSA)是医院感染的主要病原菌。由于MRSA对β-内酰胺类及其他抗生素的广泛耐药,MRSA感染导致的疾病难以治愈[1]。据报道,一些天然产物、化学合成物能够增强MRSA对β-内酰胺类抗生素的敏感性[1],这些化合物被称为"针对MRSA的β-内酰胺类抗生素增效剂(intensifier of β-lactam-susceptibility in MRSA, ILSMR)"[2],这种作用被称为协同抗菌作用(synergistic antibacterial activity)。近期本课题组发现山楂中75%乙醇提取物具有较显著的

作者简介:姜 珂,男,重庆市人,硕士研究生,检验技师,主要从事天然药物中抗菌活性成分的分离提取方面的研究。E-mail:jiaaf@126.com
通信作者:郑 江,电话:(023)68754435,E-mail:zhengj@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2009-02-16;修回日期:2009-03-14

联合β-内酰胺类抗生素对 MRSA 的体外协同抗菌作用。我们对山楂 75% 乙醇提取物中抗菌增效的有效活性组分进行了富集,并将相对活性较强的组分分别对苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉等 4 种β-内酰胺类抗生素的体外协同抗菌增效活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验用山楂为山楂属植物山楂(*Crataegus pinnatifida*)的干燥成熟果实(重庆康迪中药材公司),D-101 大孔树脂(天津海光化工有限公司),分析纯甲醇、乙醇、乙酸乙酯、正丁醇(重庆川东有限化工公司),旋转蒸发仪(BUCHI R-205 型),冻干机(SAVANT 公司),比浊仪(Bio-Rad 公司),MRSA 临床分离株(第三军医大学西南医院临床药理基地提供),96 孔细菌培养板(Costar 公司),苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉(重庆药友),M-H 肉汤培养基(北京陆桥技术)。

1.2 山楂的提取分离

山楂 3 kg 去核切片,75% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h;提取液减压浓缩回收乙醇,得浸膏 563 g;将浸膏溶解加蒸馏水至 3 L,过滤除去不溶杂质,依次经等体积乙酸乙酯、正丁醇分别萃取 3 次,并收集正丁醇层,得到浸膏约 132 g;将正丁醇层浸膏经 D-101 大孔树脂柱色谱分离,乙醇-水梯度洗脱,收集体积分数为 50% 乙醇-水洗脱部分,回收溶剂,低温真空干燥得红棕色粉末约 16 g;取 8 g 样品经硅胶柱色谱,氯仿-丙酮梯度洗脱,得到 Fr. 1 ~ Fr. 8 共 8 个部位;经薄层硅胶分析,合并 Fr. 4、Fr. 5 部位,低温真空干燥得组分 CP 约 600 mg。

1.3 微量稀释法药敏实验

1.3.1 实验菌株的培养 实验用 MRSA 为临床分离株,由第三军医大学西南医院临床药理基地提供。MRSA 的判定采用常规方法培养分离鉴定金黄色葡萄球菌,再根据 NCCLS (2004)标准,用苯唑西林测定最低抑菌浓度,大于 4 μg/ml,为 MRSA。菌株 37 ℃,M-H 肉汤培养基复苏传代 2 次,接种至血琼脂平板过夜,取单个菌落接种至 10 ml M-H 肉汤,120 r/min 振摇 6 h,至生长对数期,测定波长为 600 nm 的吸光度值[$D(600)$],推算细菌浓度,稀释至 5×10^5CFU/ml 备用。

1.3.2 单独抑菌实验 肉汤稀释法(微量法)[3]分别测定苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉以及组分 CP 的单独 MIC。将苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉以及组分 CP 分别以灭菌的 MH 肉汤配置成 2 mg/ml,2 倍系列稀释至 1 μg/ml,分别取每个浓度药液 20 μl 加入 180 μl 备用菌液,37 ℃,每小时测定[$D(600)$],绘制时间-杀菌曲线,24 h 观察联合抑菌指数(MIC)值。

1.3.3 联合抑菌实验 微量棋盘法[4]分别考察苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉联合 CP 组分的抑菌作用。生理盐水配制各抗生素溶液 10.24 mg/ml 至 10 μg/ml,组分 CP 溶液 20.48 mg/ml 至 640 μg/ml(均为 2 倍系列稀释),每孔加入 160 μl 备用菌液,20 μl 各浓度苯唑西林和 20 μl 各浓度组分 CP。37 ℃,每 1 小时测定[$D(600)$],绘制时间-杀菌曲线,24 h 观察 MIC 值,记录两药联合应用时各自的 $MIC_{抗生素联用}$ 和 $MIC_{CP联用}$,结合单独应用药物时的最低抑菌浓度 $MIC_{抗生素单用}$ 和 $MIC_{CP单用}$,以计算部分抑菌指数(FIC)。

FIC 指数计算与判读标准[5]:

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

FIC 指数 <0.5,为协同作用;0.5 ~ 1.0,为相加作用;1.0 ~ 2.0,为无关作用;>2.0,为拮抗作用

1.4 统计学分析

以上实验均重复 5 次,实验数据应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,所有计量资料表示为 $\bar{x}\pm s$,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 微量肉汤稀释法测定各抗生素和组分 CP 的单独最低抑菌浓度

苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉 MIC 分别为 256、512、512、128 μg/ml,均远大于 4 μg/ml 的敏感范围,提示本株 MRSA 对β-内酰胺类抗生素严重耐药。组分 CP 的 MIC 值也较高为 1 024 μg/ml,提示单独抑菌活性微弱。

2.2 微量棋盘法测定 4 种抗生素分别联合组分 CP 的 FIC 指数

联合药敏实验结果显示:128 μg/ml 组分 CP 具有最佳协同抑菌作用,苯唑西林对 MRSA 的 MIC 从 256 μg/ml 降至 2 μg/ml;舒氨西林的 MIC 从 512 μg/ml 降至 32 μg/ml;氨苄西林的 MIC 从 512 μg/ml 降至 16 μg/ml;头孢唑啉的 MIC 从 128 μg/ml 降至 2 μg/ml。其 FIC 指数均小于 0.5,提示组分 CP 与几种抗生素均具有协同抗菌作用(表 1)。

表 1 联合用药时各药物的协同 MIC 值和 FIC 指数

药物名称	MIC				FIC 指数
	抗生素联合	抗生素单独	CP 联合	CP 单独	
苯唑西林	2	256	128	1 024	0.13
舒氨西林	32	512	128	1 024	0.19
氨苄西林	16	512	128	1 024	0.16
头孢唑啉	2	128	128	1 024	0.14

2.3 药敏实验结果

时间杀菌曲线提示,菌液对照组,细菌在 5 h 后进入对数生长期,菌液浓度迅速上升;亚 MIC 浓度的 4 种抗生素和组分 CP 均无法完全抑制细菌生长,24 h 培养后,菌液浓度与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$,图 1)。在抗生素与组分 CP 联合应用组,细菌生长受到明显抑制,无法观察到对数生长期,24 h 培养后,菌液浓度显著降低,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。提示组分 CP 与 4 种β-内酰胺类抗生素均具有较好的体外协同抗菌作用。

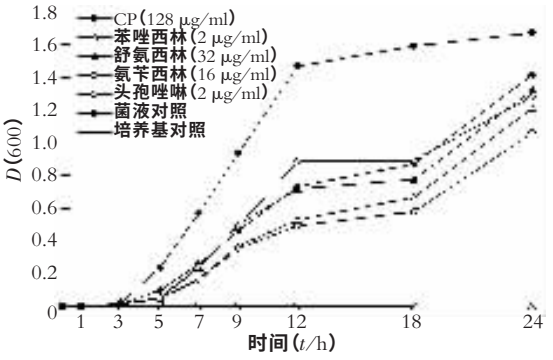


图 1　药物单独作用时间-杀菌曲线分析结果

3　讨论

有报道表明,从天然中草药物中提取具有有效生物活性的组分,即可以有效的提高抗生素的敏感度[6],如表没食子酸和黄芹苷可增强 β-内酰胺类抗生素对 MRSA、MSSA 的敏感度[7, 8],儿茶素可增强苯唑西林对 MRSA 的敏感度[9],来自于刺桐中的异黄酮可增强莫匹罗星对 MRSA 的敏感度[10]等。而且这些化合物可以最大程度的减少抗生素的毒副作用,因此从植物中寻找有抗菌增效活性的先导化合物成为开发新药新思路。

山楂为蔷微科山楂属植物山里红(*Crataegus pinnatifida Bge. var. major N. E.* Br)或山楂(*C. pinnatifida Bge.*)的干燥成熟果实。主要功能为消食健胃、行气散瘀。用于肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭、产后瘀阻、心腹刺痛、高血脂症等[11],之前少见报道山楂提取物具有抗菌增效作用。本课题组发现山楂提取物具有联合 β-内酰胺类抗生素对 MRSA 的体外协同抗菌作用。经过进一步对山楂进行系统分离提取,以体外药敏实验活性作为追踪目标,将 75% 乙醇提取物依次经乙酸乙酯、正丁醇萃取,取正丁醇层,经 D-101 大孔树脂、硅胶柱色谱分离得到联合抑菌活性最为显著的组分 CP。

在对 MRSA 的体外药敏实验中,我们观察到几种临床常用的 β-内酰胺类抗生素苯唑西林、舒氨西林、氨苄西林、头孢唑啉对 MRSA 的 MIC 均远远高于 4 μg/ml,属于严重耐药;山楂提取物 CP 的单独抑菌活性也不明显,MIC 约为 1 mg/ml。但在联合药敏实验中,亚 MIC 浓度的山楂组分 CP 显著降低了几种抗生素的 MIC 值,其中苯唑西林和头孢唑啉的 MIC 均下降到了 2 μg/ml 的敏感范围,且和 4 种抗生素的 FIC 值分别为:0.13、0.19、0.16、0.14, 均小于 0.5,提示联合用药呈良好的协同抗菌作用。结合时间-杀菌曲线进一步提示联合用药能有效阻止细菌进入对数生长期,达到抑制细菌生长的作用。

上述实验结果提示,对于耐药严重的 MRSA 菌株,单独使用常规 β-内酰胺类抗生素已经不能起到有效的抑制 MRSA 的作用,而联合山楂组分 CP 则能够显著的减少 β-内酰胺类抗生素的用量,增强杀菌作用。对于 MRSA 感染患者,进行天然药物成分筛选,并应用于增强 β-内酰胺类抗生素药物的敏感性,降低抗生素的用量,减轻毒副作用,探索联合用药的治疗方法具有重要意义。

参考文献:

[1] 梁锦湄,梁蓓蓓,王　睿. 耐甲氧西林金葡球菌的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(13): 1097 - 1100.

[2] Kondo K, Takaishi Y, Shibata H, *et al*. ILSMRs (intensifier of beta-lactam-susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus aureus) from Tara [Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze] [J]. Phytomedicine, 2006, 13(3): 209 - 212.

[3] 赵心懋,徐英春,段　琼, 等. 氟康唑体外抗菌活性及五种体外敏感试验方法的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(2): 128 - 132.

[4] 徐苏云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 1647 - 1670.

[5] George M E, Robert C, Moellering J R. Antimicrobial Combinations [M]//Lorian V. Antibootics in Laboratory Medicine. 4th ed. Washington:Society for microbiology, 1996: 330.

[6] Hemaiswarya S, Kruthiventi A K, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases [J]. Phytomedicine, 2008, 15(8): 639 - 652.

[7] Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, *et al*. Nucleotide sequence and characterization of Staphylococcus aureus norA gene, which confers resistance to quinolones [J]. J Bacteriol, 1990, 172(12): 6942 - 6949.

[8] Liu I X, Durham D G, Richards R M. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and other beta-lactam-resistant strain of S. aureus [J]. J Pharm Pharmacol, 2000, 52(3): 361 - 366.

[9] Takahashi O, Cai Z, Toda M, *et al*. Appearance of antibacterial activity of oxacillin against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the presence of catechin[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1995, 69(10): 1126 - 1134.

[10] Sato M, Tanaka H, Oh-Uchi T, *et al*. Antibacterial activity of phytochemicals isolated from Erythrina zeyheri against vancomycin-resistant enterococci and their combinations with vancomycin[J]. Phytother Res, 2004, 18(11): 906 - 910.

[11] 翁毅力. 山楂的药理作用[J]. 中国药业, 2005, 14(12): 89 - 90.

(编辑　张　维)