

# A Comparative Study on the Activity of Saikosaponin d and Azithromycin against Mycoplasma

Yali Jia<sup>1\*</sup>, Jue Liu<sup>2</sup>, Liming Wu<sup>2</sup>, Yinglian Cai<sup>1</sup>, Shenghai Wu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Venereology, Cancer Hospital, Hangzhou Zhejiang

<sup>2</sup>Department of Dermatology and Venereology, First People's Hospital, Hangzhou Zhejiang

Email: \*shjiayali@sina.com

Received: Nov. 9<sup>th</sup>, 2018; accepted: Nov. 23<sup>rd</sup>, 2018; published: Nov. 30<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

**Objective:** To detect the antibacterial activity of Saikosaponin monomer d (Sd) in Radix Bupleuri and to evaluate the antibacterial activity of Sd against azithromycin-resistant Mycoplasma strains and its interaction with azithromycin. **Methods:** The minimum inhibitory concentration (MIC) of 20 azithromycin-resistant Mycoplasma strains were determined by the chessboard microdilution method when using Saikosaponin d, azithromycin alone and in combination. Partial antibacterial concentration index (FIC) was calculated and interaction between these two drugs were determined. **Results:** When used alone, the geometric mean (GM) values of MIC of Sd and azithromycin against azithromycin-resistant Mycobacterium were 1.008 ug/mL and 1.941 ug/mL, respectively. When used in combination, the GM values of Sd and azithromycin decreased to 0.346 ug/mL and 1.189 ug/mL, respectively. The MIC values significantly differ between the two drugs used alone and in combination ( $P < 0.05$ ). When used in combination, the two drugs showed synergistic or additive effect toward 20 resistant strains. **Conclusion:** Sd of Saikosaponin showed a strong inhibitory effect on azithromycin-resistant *Ureaplasma urealyticum* strains and has synergistic or additive effect with azithromycin.

## Keywords

Saikosaponin Monomer-d, *Ureaplasma Urealyticum*, Azithromycin, Antibacterial Activity *in Vitro*

# 柴胡皂苷d与阿奇霉素抗耐药支原体活性的对比研究

贾亚利<sup>1\*</sup>, 刘 珏<sup>2</sup>, 吴黎明<sup>2</sup>, 蔡莺莲<sup>1</sup>, 吴盛海<sup>2</sup>

\*通讯作者。

<sup>1</sup>杭州市肿瘤医院皮肤科, 浙江 杭州

<sup>2</sup>杭州市第一人民医院皮肤科, 浙江 杭州

Email: shjiayali@sina.com

收稿日期: 2018年11月9日; 录用日期: 2018年11月23日; 发布日期: 2018年11月30日

## 摘要

**目的:** 检测柴胡中具有抗菌活性的柴胡皂苷单体d (Sd), 研究该单体对支原体阿奇霉素耐药株的抑菌作用及其与阿奇霉素的相互作用。**方法:** 采用棋盘微量稀释法, 测定单用柴胡皂苷d, 阿奇霉素及二者联用使用时, 对20株阿奇霉素耐药支原体菌株的最低抑菌浓度MIC, 计算部分抑菌浓度指数(FIC), 判定二药相互作用。**结果:** 单独用药时Sd及阿奇霉素, 对耐阿奇霉素支原体株MIC的几何均数值GM值分别为1.008 ug/mL、1.941 ug/mL。联合用药时, Sd和阿奇霉素的GM值分别降低为0.346 ug/mL和1.189ug/mL。2种药物单用和联合用药时, MIC值差异均有统计学意义(P < 0.05)。联用时在20株耐药株均表现为协同或者相加作用。**结论:** 柴胡皂苷单体Sd对解脲支原体耐阿奇霉素菌株有较强的抑制作用, 与阿奇霉素有协同或者相加作用。

## 关键词

柴胡皂苷单体, 解脲支原体, 阿奇霉素, 体外抗菌活性

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

支原体感染已经成了泌尿系感染中比较普遍的现象, 当机体免疫力低下或者黏膜受损时, 粘附于细胞表面的解脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*, Uu)导致细胞损伤, 炎症上行, 引起非淋球菌性尿道炎, 进而引发前列腺炎、肾盂肾炎、女性盆腔炎、阴道宫颈感染等多种疾病, 并可能与女性不孕、习惯性流产、胎儿宫内发育迟缓有关[1] [2] [3]。在男性, Uu 感染可以影响精子的浓度、活动度、形态, 并且还可能导致破坏生精细胞, 从而导致男性不育[4]。临床治疗上一直选用抗生素, 大环内酯类的阿奇霉素是治疗支原体感染的一线用药, 但是耐药率已经越来越普遍。寻找一种有针对性的药物是一种治疗的方向[5]。我国的中草药资源丰富, 居于世界首位, 但草药的使用多为复方制剂, 使其作用机理不够清晰, 影响了它的进一步发展。本实验目的是研究 Sd 对阿奇霉素耐药解脲支原体菌株的抗菌作用及其与阿奇霉素联合抗菌作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料药品和培养基

阿奇霉素针剂, 购自东北制药企业沈阳第一制药有限公司。支原体液体培养基珠海迪尔生物工程有限公司。受试菌株, 阿奇霉素耐药支原体菌株分离株 20 株, 源自市一医院妇产科及皮肤科。临床分离培养后经液体培养阿奇霉素药敏 MIC  $\geq$  64 ug/ml。柴胡皂苷 d 购自中国药品生物制品鉴定所。

## 2.2. 实验方法药物稀释液的准备

用无水乙醇将柴胡皂苷单体 d (1 g)全部溶解, 再加灭菌的双蒸水至需要的体积, 稀释浓度为 1280 ug/ml 备用。阿奇霉素针剂同样用灭菌的双蒸水配成浓度为 1280 ug/ml 的备用液。将配置好的柴胡皂苷 d 及阿奇霉素药液置于 4 度冰箱备用。

## 2.3. 支原体菌悬液制备和接种

受试菌株从临床分离后, 平时贮存于 $-196^{\circ}\text{C}$ 液氮中。使用时室温解冻, 再接种至支原体液体培养基, 置于 $37^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中 48 小时, 至生长最佳状态( $\text{CFU} > 10^4$ ) [6], 取 100 ul 接种于预热的药物敏感测试板。

## 2.4. 阿奇霉素与 Sd 对支原体耐药株的联合作用[7]

棋盘微量稀释法能比较明确地检测出两种不同药物, 当它们以不同浓度的比例混合时, 抗菌的效果究竟是叠加还是拮抗会比较明确。测定两种药物共同作用的最低抑菌浓度, 需要使两块 96 小孔板, 每个孔中既含有各种浓度的阿奇霉素与 Sd 的混悬液, 又含有不同浓度的阿奇霉素单药与不同浓度的 Sd 单药。

操作步骤: 阿奇霉素的最高浓度为 256 ug/ml, 柴胡皂苷 d 的最高浓度为 512 ug/ml, 并在 20 根无菌小试管中对两种药物进行 10 级倍比稀释。在 2 块 96 孔板中, 最上面的一排和最左边的一列的 1~10 小孔中分别加入 50 ul 两种不同浓度组合的阿奇霉素和柴胡皂苷 d 溶液, 在 100 个孔中形成 100 个不同药物浓度组合, 然后每个小孔中加入 100 ul 培养生长良好的支原体菌悬液。横向第 11 排测仅有阿奇霉素作用时的 MIC 值, 纵向第 11 列测柴胡皂苷 d 单独作用时的 MIC 值。加 200 ul 支原体液小孔(不加其他抗菌液)作为支原体正常的对照, 单单加 200 ul 液体支原体培养基(不加药物)作为空白对照。在 $37^{\circ}\text{C}$ 培养 48 小时, 记录单独应用两药的 MIC 值, 并选择最佳组合效应时两药各自的 MIC。

两种抗菌药物相互作用方式判定: 计算部分抑菌浓度指数(FIC), 计算的公式为:  $\text{FIC 指数} = \text{A 药联合时 MIC/A 药单用时 MIC} + \text{B 药联合时 MIC/B 药单用时 MIC}$ 。当 FIC 指数小于等于 0.5 时, 为协同作用; 当 FIC 指数在 0.5 和 1 之间时, 为相加作用; 当 FIC 指数在 1 和 2 之间, 认为它们的相互作用无关; 当 FIC 大于 2, 为拮抗作用。

最后结果的判读: 将两块 96 孔板置于 $37^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中放置 48 小时, 采用宏观视觉判断结果。药物敏感终点判读参考 M-27 中对微量液体培养基稀释法标准, 抗生素类药物以 80%抑菌作为观察终点, 判断最低抑菌浓度(MIC)。柴胡单体的结果判断参照抗生素类药物进行。

## 2.5. 统计学方法

采用 SPSS11.0 分析处理数据, 这两种药物单独使用和共同作用的 MIC 值转换成对数后, 再进行配对资料 t 检验。如果  $P < 0.05$ , 则认为有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. 阿奇霉素对解脲支原体的抑菌作用

单独用药时, 阿奇霉素的最低抑菌浓度 MIC 值的范围为 64~128 ug/mL, MIC 的几何均数值(GM 值)为 1.941 ug/mL。联合用药时, 阿奇霉素的 MIC 范围为 8~32 ug/mL, GM 值为 1.189 ug/mL。将单独用药 MIC 值(C)和联合用药 MIC 值(D)转换成对数后, 进行配对资料 t 检验, 组别之间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 3.2. Sd 的抑菌作用

仅仅使用一种药物时, Sd 的 MIC 范围是 2~32 ug/mL, MIC 的几何均数值(GM 值)为 1.008 ug/mL。当两种药共同作用时, Sd 的 MIC 范围为 0.5~8 ug/mL, GM 值为 0.346 ug/mL。将使用一种药物的 MIC 值(A)和共同作用时的 MIC 值(B)转换成对数后, 再进行配对资料 t 检验, 结果显示两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

**Table 1.** Determination of MIC value (ug/ml) and interaction mode between Sd and Azi for Mycoplasma resistant strains  
**表 1.** Sd 与 Azi 对支原体耐药株的 MIC 值(ug/ml)及相互作用方式判定

编号	Sd MIC		Azi MIC		FIC	作用方式
	单用药 A	联合用药 B	单用药 C	联合用药 D		
M1	8	1	64	16	0.375	协同
M2	8	2	64	16	0.500	相加
M3	16	4	128	16	0.375	协同
M4	8	0.5	64	8	0.375	协同
M5	32	8	128	16	0.375	协同
M6	16	4	64	8	0.375	协同
M7	16	2	64	16	0.375	协同
M8	16	8	128	16	0.375	协同
M9	32	8	128	32	0.500	相加
M10	16	2	64	16	0.375	协同
M11	16	4	128	32	0.375	协同
M12	8	2	64	16	0.500	相加
M13	4	2	64	32	0.750	相加
M14	16	4	128	32	0.500	相加
M15	2	0.5	64	8	0.500	相加
M16	4	1	64	16	0.500	相加
M17	16	4	128	16	0.375	协同
M18	8	2	128	32	0.500	相加
M19	16	2	128	32	0.375	协同
M20	2	0.5	64	16	0.500	相加
ATCC27813	0.5	0.5	64	16	0.750	相加

### 3.3. 阿奇霉素与 Sd 对解脲支原体耐药株的联合作用

阿奇霉素与 Sd 联合用药时, 体外的相互作用关系在 11 株表现为协同作用方式, 在 9 株表现为相加作用方式。见表 1。

## 4. 结论

柴胡皂苷 d 在体外对耐阿奇霉素的解脲支原体耐药株有明显的抑制作用, 与阿奇霉素的作用表现为

协同作用或者相加作用。

## 5. 讨论

阿奇霉素属于大环内酯类抗生素，它作为指南推荐的抗支原体一线治疗药物，在临床使用中，胃肠道的副作用发生率很高，多数患者都会出现恶心、食欲不振等肠胃不适，严重者呕吐。并且在近几年的研究中发现，它的耐药率比例也较高，导致临床治疗失败案例逐渐增多，导致感染的病情迁延不愈[8]。我们所使用的 20 株耐药支原体株，均来自于泌尿生殖道炎症反复发作患者的临床分离株。

为了克服这些合成化合物存在的诸多弊端，一些医药科技工作者逐渐将研究重点转向了天然药物，在全球范围内掀起了研制和开发天然药物的热潮。柴胡皂苷 d 在我们的实验中也显示了很强的抑菌活性。那么它的抑菌作用机理还没有一个准确的认识。陈志宝(文献)等人研究了柴胡皂苷 a 对金黄色葡萄球菌的抑菌作用[9]。他们采用基因芯片检测，结果表明，柴胡皂苷 a 作用于金黄色葡萄球菌 45 分钟后引起相关基因表达水平的改变在所有监测基因中，26 个上调基因，68 个下调基因，其中有 13 个毒力因子的表达受到影响，且表达水平全部下调，即抑制了金葡菌的毒力水平；1 个编码超氧负离子压力反应蛋白基因 *vraR* 和 *vraS* 被诱导上调；还有 4 个核黄素合成蛋白 *ribA*, *B*, *H*, *D* 被显著抑制，这几个是酶的辅助因子的合成基因，在呼吸代谢途径起作用，同时还与超氧负离子有关。

阿奇霉素是大环内酯类抗生素，通过与细菌核糖体 50s 亚基结合，阻碍细菌转肽过程，抑制依赖于 RNA 的蛋白质合成从而达到抗菌作用。支原体对它的耐药产生机制主要是生物膜的形成，生物膜增强了 Uu 对大环内酯类、四环素等多种常用抗生素的抵抗力[10]。那么我们可以认为柴胡皂苷 d 在基因水平上降低了多糖及某些蛋白质的合成从而抑制生物膜的形成，所以与阿奇霉素在抑菌作用上起到协同或者相加作用。这些都需要进一步的科学实验证实。

一个新的化合物或者中药的某种成分成为一种新的抗菌药物，是一个漫长的过程，这其中最开始的前期研究就是发现它在体外的抗菌活性，利用较为简便的实验方法，例如液体微量稀释法，来测试它对致病菌的抑制作用或者杀菌作用，为后续的深入研究打下基础。就柴胡皂苷 d 而言，朴英兰沈亮亮[7]等的前面的研究中也发现了它对真菌有很好的抗菌作用。我们观察到的柴胡皂苷单体 d 的体外实验中，对支原体有较好的抑制作用，并且在与常用药物阿奇霉素有协同抗菌作用，值得对其进行进一步的深入研究，也应该测试其对于见用的球菌、杆菌等致病微生物的体外抗菌实验研究，为最终进行动物体内药理研究打下基础。

## 参考文献

- [1] Taylor-Robinson, D. and Lamont, R.F. (2011) Mycoplasmas in Pregnancy. *BJOG*, **118**, 164-174. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02766.x>
- [2] Bayraktar, M.R., Ozerol, T.H., Gucluer, N., et al. (2010) Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma Urealyticum* in Pregnant Women. *International Journal of Infectious Diseases*, **14**, 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.03.020>
- [3] Gupta, A. and Gupta, S. (2009) Correlation of Mycoplasma with Unexplained Infertility. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **280**, 981-985. <https://doi.org/10.1007/s00404-009-1042-z>
- [4] Rybar, R., Prinosilova, P., Kopecka, V., et al. (2011) The Effect of Bacterial Contamination of Semen on Sperm Chromatin Integrity and Standard Semen Parameters in Men from Infertile Couples. *Andrologia*, 2011.
- [5] 陈芳芬, 杨泽妹, 许爱玲, 等. 不孕症妇女衣原体和支原体感染及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(17): 3993-3996.
- [6] 曹玉璞, 叶元康, 等. 支原体与支原体病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [7] 朴英兰, 沈亮亮, 叶元康, 等. 五环三萜类柴胡皂苷单体对白念珠菌伊曲康唑耐药株活性研究[J]. 中国真菌学杂志, 2012, 7(1): 8-11.

- 
- [8] Maeda, S., Yasuda, M., *et al.* (2009) Azithromycin Treatment for Nongonococcal Urethritis Negative for *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. *International Journal of Urology*, **16**, 215-216. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2008.02196.x>
- [9] 陈志宝, 欧阳红生, 邓旭明, 等. 柴胡皂苷 a 对金黄色葡萄球菌基因转录表达谱的影响[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(7): 966-968.
- [10] Garela-Castillo, M., Morosini, M.I., Galvez, M., *et al.* (2008) Differences in Biofilm Development and Antibiotic Susceptibility among Clinical *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* Isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62**, 1027-1030. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn337>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-540X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>  
期刊邮箱: [md@hanspub.org](mailto:md@hanspub.org)