

硫酸阿米卡星与黄连成分联合用药对多重耐药肺炎克雷伯菌的体外活性研究

姜登钊¹, 吴青静¹, 刘雨霏¹, 帅丽华^{2*}, 刘怀², 孙晓红², 张娅²

¹九江学院药学与生命科学学院, 江西 九江

²九江学院附属医院检验科, 江西 九江

收稿日期: 2021年10月1日; 录用日期: 2021年10月28日; 发布日期: 2021年11月4日

摘要

多重耐药肺炎克雷伯菌导致的感染成为临床治疗的难点, 本研究探索硫酸阿米卡星联合用药对多重耐药肺炎克雷伯菌的体外抑制作用, 为临床用药提供数据参考。分别检测黄连提取物、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀及硫酸阿米卡星对多重耐药肺炎克雷伯菌的最小抑菌浓度, 并以棋盘式微量稀释法分别检测三种药物与硫酸阿米卡星联合用药的抑菌效果。实验结果表明, 联合用药后对全部耐药菌均表现为协同或相加作用, 对治疗多重耐药肺炎克雷伯菌有较好的临床应用价值, 值得进一步研究。

关键词

硫酸阿米卡星, 黄连提取物, 盐酸小檗碱, 盐酸巴马汀, 肺炎克雷伯菌, 多重耐药

Research on Antibacterial Activities of Amikacin Sulfate Combined with the Ingredients of *Coptis chinensis* against Multiple Drug Resistance *Klebsiella pneumoniae* in vitro

Dengzhao Jiang¹, Qingjing Wu¹, Yufei Liu¹, Lihua Shuai^{2*}, Huai Liu², Xiaohong Sun², Ya Zhang²

¹School of Pharmacy and Life Science, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi

²Department of Clinical Laboratory, Jiujiang University Hospital, Jiujiang Jiangxi

*通讯作者。

文章引用: 姜登钊, 吴青静, 刘雨霏, 帅丽华, 刘怀, 孙晓红, 张娅. 硫酸阿米卡星与黄连成分联合用药对多重耐药肺炎克雷伯菌的体外活性研究[J]. 药物资讯, 2021, 10(6): 315-320. DOI: 10.12677/pi.2021.106039

Abstract

Infection caused by multiple drug resistance (MDR) *Klebsiella pneumoniae* has become a difficulty in clinical treatment. This study explored the inhibitory effect of amikacin sulfate combined with drugs on MDR *K. pneumoniae* *in vitro*, and provided data reference for clinical medication. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the extract of *Coptis chinensis*, berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and amikacin sulfate on MDR *K. pneumoniae* were determined firstly, and then the antibacterial activities of amikacin sulfate combined with the other three medicines were observed by broth microdilution checkerboard method together with their Fractional Inhibitory Concentration (FIC). The inhibitory effects were showed synergistic or additive effects after combination on all of the ten MDR *K. pneumoniae* *in vitro* and had good clinical application value in the treatment of MDR *K. pneumoniae*, which was worthy of further study.

Keywords

Amikacin Sulfate, The Extract of *Coptis chinensis*, Berberine Hydrochloride, Palmatine Hydrochloride, *Klebsiella pneumoniae*, Multiple Drug Resistance

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是一种具有荚膜结构的侵袭力较强的革兰阴性杆菌,可引起呼吸道、血液、腹腔及泌尿系统等部位感染。2014~2019年中国耐药监测网(CHINET)统计结果显示肺炎克雷伯菌在所有致病菌的检出率仅次于大肠埃希菌,位居第二,对头孢曲松和头孢噻肟的耐药率分别为31.5%~34.6%、31.6%~39.9%;对环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率分别为17.3%~22.4%和13.6%~19.0%;对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为4.8%~10.5%和4.5%~10.9%,均出现了显著的上升[1],产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是其主要的多重耐药机制[2]。ESBLs的主要特点是由质粒介导,以产ESBLs大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为代表菌株[3],耐药菌株不仅对 β -内酰胺类抗生素呈现耐药,并且对其它类抗生素交叉耐药,特别是产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌,甚至令临床束手无策,病死率特别高,有报道30d病死率为41.6%[4],因此亟需加快新药研发步伐,但是目前高昂的研发成本及较低的研发效率促使科研人员寻求其它的治疗途径。中药在抗菌作用上蕴藏着巨大潜力,不论是单方还是复方制剂在抑制细菌方面都有明显效果,一些医药工作者在对中药抗肺炎克雷伯菌感染的研究工作中筛选发现了一些抗菌有效成分或联合用药方案[5][6][7][8]。本实验通过测定黄连提取物、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀等中药组分联合硫酸阿米卡星对肺炎克雷伯菌耐药株的体外抗菌作用,为临床用药方案提供数据依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料与仪器

硫酸阿米卡星对照品(批号130335-200204)、盐酸小檗碱对照品(批号110713-201212)、盐酸巴马汀(批

号 110732-201510)均购自中国食品药品检定研究院。黄连药材购自九江开心人大药房,经九江学院刘可越教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptischinnsis* Franch.的干燥根茎。以 95%乙醇,超声功率 400 W 提取 3 次,每次 15 min,合并三次提取液浓缩至浸膏,冷冻干燥得到黄连提取物。

高频数控超声波提取仪 KQ-500TDV(昆山市超声仪器有限公司),旋转蒸发仪(莱伯泰科 EV341),真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司),实验室超纯水设备(重庆摩尔生物技术有限公司),立式压力蒸汽灭菌器(上海申安),Phoenix-100 全自动微生物鉴定/药敏仪及配套鉴定药敏板条(美国 BD 公司)、BACTEC FX 全自动血培养仪(美国 BD 公司)、Heal Force 生物安全柜(B2 级)、-80℃冰箱(海尔 DW-86L386)、哥伦比亚血平板(OXOID)、中国兰琼脂及营养肉汤琼脂(杭州滨和)。

2.2. 肺炎克雷伯菌耐药菌株的菌种鉴定、保存、复苏与筛选

肺炎克雷伯菌多重耐药株分离自九江学院附属医院临床感染性标本,菌种的鉴定和常规药物敏感性实验由美国 BD Phoenix-100 全自动微生物鉴定/药敏仪及配套鉴定药敏板条完成。各项操作均严格按仪器标准操作规程进行。大肠埃希菌标准株(ATCC25922)及肺炎克雷伯菌标准株(ATCC700603)由中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)提供,所有实验菌种均于鉴定和药敏试验完成后保存于-80℃冰箱。除标准菌株 ATCC25922 外,选择 2016~2019 年间 80 株对头孢噻肟最小抑菌浓度 MIC > 32 μg/mL 的肺炎克雷伯菌,实验前将这些菌株从冰箱取出、复苏,转种于哥伦比亚血平板和中国兰平板,用于体外联合用药筛选研究。

2.3. ESBLs 检测方法及相关标准

ESBLs 检测参照 CLSI M100-S24 文件推荐的纸片扩散确证法进行检测。用每片含 30 μg 头孢他啶、30 μg 头孢噻肟和头孢他啶/克拉维酸(30 μg/10 μg)或头孢噻肟/克拉维酸(30 μg/10 μg)的复合纸片进行试验,当任何一种复合纸片抑菌圈直径大于或等于其单独药敏纸片抑菌圈直径 5 mm 时可确证该菌株产 ESBLs。抗生素的敏感(S)、中介(I)、耐药(R)的判断折点及试验方法、质量控制遵循 CLSI M100-S30 文件:肺炎克雷伯菌对阿米卡星的 MIC ≥ 64 μg/mL 为耐药, MIC = 32 μg/mL 为中介, MIC ≤ 16 μg/mL 为敏感[9]。

2.4. 体外抑菌试验

以肺炎克雷伯菌标准株(ATCC700603)和大肠埃希菌标准株(ATCC25922)为质控菌株,采用微量肉汤稀释法分别测定硫酸阿米卡星、黄连提取物、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀各药物的 MIC 值,根据单药抑菌试验结果,按照棋盘稀释法进行联合抑菌作用观察,计算部分抑菌浓度(FIC)指数。FIC = MIC_{甲药联用}/MIC_{甲药单用} + MIC_{乙药联用}/MIC_{乙药单用}, FIC ≤ 0.5 为协同作用, 0.5 < FIC ≤ 1 为相加作用, 1 < FIC ≤ 2 为无关作用, FIC > 2 为拮抗作用[10]。

3. 结果

3.1. 多重耐药肺炎克雷伯菌筛选结果

从 82 株对头孢噻肟的 MIC > 32 μg/mL 的肺炎克雷伯菌中,共筛选出 10 株对头孢噻肟 MIC ≥ 256 μg/mL, 头孢他啶 MIC > 32 μg/mL, 头孢吡肟 MIC > 16 μg/mL, 氨曲南 MIC > 16 μg/mL, 同时对阿米卡星呈耐药(5 株)、中介(3 株)、敏感(2 株)的多重耐药肺炎克雷伯菌(编号: 164153、164368、166276、171245、175173、177986、186472、187765、191343、193215),其中 177986 号对亚胺培南和美罗培南 MIC > 8 μg/mL, 显示对碳青霉烯类抗生素耐药。

3.2. ESBLs 检测结果

上述筛选出的 10 株肺炎克雷伯菌,经纸片扩散确证法检测均为产 ESBLs 多重耐药菌株。

3.3. 联合用药试验结果

实验结果表明,黄连提取物、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀与阿米卡星联用后,所筛选的 10 株多重耐药菌对阿米卡星的 MIC 值出现明显下降,降低了 2~4 个浓度梯度;而黄连提取物、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的 MIC 都降低了 2~8 个浓度梯度,表现出明显的协同或相加作用(见表 1, 表 2, 表 3),显示出非常好的联合用药效果;尤其是盐酸巴马汀与阿米卡星联用后对所测定耐药菌均产生协同作用,且所有菌株对阿米卡星的 MIC 值降至 16 $\mu\text{g/ml}$ 及以下,成为敏感菌株($\text{MIC} \leq 16$),显示出非常良好的体外抗菌效果。

Table 1. Antibacterial effect of the extract of *Coptis chinensis* combined with amikacin on *Klebsiella pneumoniae* producing ESBLs *in vitro*

表 1. 黄连提取物与阿米卡星联用对产 ESBLs 酶肺炎克雷伯菌的体外抗菌作用

| 菌株 | 黄连提取物($\mu\text{g/ml}$) | | 阿米卡星($\mu\text{g/ml}$) | | FIC | 作用方式 |
|------------|---------------------------|-----|--------------------------|----|-------|------|
| | 单用 | 联用 | 单用 | 联用 | | |
| ATCC25922 | 78 | 4.9 | 4 | 1 | 0.313 | 协同 |
| ATCC700603 | 78 | 4.9 | 4 | 1 | 0.313 | 协同 |
| 164153 | 2500 | 39 | 8 | 2 | 0.266 | 协同 |
| 164368 | 2500 | 78 | 16 | 1 | 0.094 | 协同 |
| 166276 | 1250 | 39 | 32 | 4 | 0.156 | 协同 |
| 175173 | 2500 | 39 | 32 | 16 | 0.516 | 相加 |
| 171245 | 2500 | 9.8 | 32 | 4 | 0.129 | 协同 |
| 177986 | 2500 | 625 | 64 | 32 | 0.750 | 相加 |
| 186472 | 2500 | 39 | 64 | 16 | 0.266 | 协同 |
| 187765 | 2500 | 78 | 128 | 32 | 0.281 | 协同 |
| 191343 | 1250 | 78 | 128 | 32 | 0.312 | 协同 |
| 193215 | 2500 | 625 | 128 | 64 | 0.750 | 相加 |

Table 2. Antibacterial effect of berberine hydrochloride combined with amikacin on *Klebsiella pneumoniae* producing ESBLs *in vitro*

表 2. 盐酸小檗碱与阿米卡星联用对产 ESBLs 酶肺炎克雷伯菌的体外抗菌作用

| 菌株 | 盐酸小檗碱($\mu\text{g/ml}$) | | 阿米卡星($\mu\text{g/ml}$) | | FIC | 作用方式 |
|------------|---------------------------|-----|--------------------------|----|-------|------|
| | 单用 | 联用 | 单用 | 联用 | | |
| ATCC25922 | 8 | 1 | 4 | 1 | 0.375 | 协同 |
| ATCC700603 | 8 | 1 | 4 | 1 | 0.375 | 协同 |
| 164153 | 512 | 32 | 8 | 2 | 0.313 | 协同 |
| 164368 | 1024 | 64 | 16 | 2 | 0.188 | 协同 |
| 166276 | 512 | 32 | 32 | 4 | 0.188 | 协同 |
| 175173 | 512 | 32 | 32 | 8 | 0.312 | 协同 |
| 171245 | 1024 | 32 | 32 | 4 | 0.156 | 协同 |
| 177986 | 1024 | 256 | 64 | 32 | 0.750 | 相加 |
| 186472 | 1024 | 64 | 64 | 4 | 0.125 | 协同 |
| 187765 | 1024 | 32 | 128 | 16 | 0.156 | 协同 |
| 191343 | 1024 | 64 | 128 | 32 | 0.313 | 协同 |
| 193215 | 1024 | 64 | 128 | 64 | 0.563 | 相加 |

Table 3. Antibacterial effect of palmatine hydrochloride combined with amikacin on *Klebsiella pneumoniae* producing ESBLs *in vitro***表 3.** 盐酸巴马汀与阿米卡星联用对产 ESBLs 酶肺炎克雷伯菌的体外抗菌作用

| 菌株 | 盐酸巴马汀($\mu\text{g/ml}$) | | 阿米卡星($\mu\text{g/ml}$) | | FIC | 作用方式 |
|------------|---------------------------|----|--------------------------|----|-------|------|
| | 单用 | 联用 | 单用 | 联用 | | |
| ATCC25922 | 128 | 2 | 4 | 1 | 0.266 | 协同 |
| ATCC700603 | 128 | 2 | 4 | 1 | 0.266 | 协同 |
| 164153 | 512 | 8 | 8 | 2 | 0.266 | 协同 |
| 164368 | 512 | 32 | 16 | 4 | 0.313 | 协同 |
| 166276 | 512 | 8 | 32 | 8 | 0.266 | 协同 |
| 175173 | 512 | 8 | 32 | 2 | 0.078 | 协同 |
| 171245 | 512 | 8 | 32 | 4 | 0.141 | 协同 |
| 177986 | 512 | 16 | 64 | 8 | 0.156 | 协同 |
| 186472 | 1024 | 32 | 64 | 8 | 0.156 | 协同 |
| 187765 | 1024 | 64 | 128 | 16 | 0.188 | 协同 |
| 191343 | 1024 | 32 | 128 | 16 | 0.156 | 协同 |
| 193215 | 1024 | 64 | 128 | 16 | 0.188 | 协同 |

4. 讨论

临床抗生素的大量应用使细菌的抗药性问题日益严重, 耐药菌感染频发, 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的检出率及耐药率均逐年升高[11] [12] [13], 近年来高致病性肺炎克雷伯菌引起致命性的社区获得性感染也备受关注[14], 如何对肺炎克雷伯菌的耐药性进行控制及治疗成为全球研究的热点和难点。相对于抗生素类药物, 中药不易使病原菌产生抗药性, 同时某些中药成分又能产生协同抗菌作用, 因此中药与抗生素的联合用药既能够有效逆转细菌的耐药性, 同时还有可能降低抗生素的用量, 减低临床用药风险, 成为一种有效的临床治疗方案[15] [16]。

氨基糖苷类抗生素对肺炎克雷伯菌的临床治疗效果较好, 但随着产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的增加, 其耐药性逐步升高, 治疗效果也在逐渐降低[17] [18]。黄连作为传统的中药材, 具有抗菌、排毒等药理作用, 常用于治疗大肠埃希菌导致的胃肠道感染, 它主要含有小檗碱、黄连碱、巴马汀等生物碱。有体外实验也表明, 黄连提取物对大肠埃希菌有着一定的抑菌作用[19] [20], 本研究组也曾报道过黄连成分与阿米卡星联合用药对多重耐药大肠埃希菌有明显协同或相加作用[21], 效果良好。本研究表明黄连提取物、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀三种中药成分单独使用时, 对多重耐药肺炎克雷伯菌的 $\text{MIC} \geq 512 \mu\text{g/ml}$, 虽然也有一定的作用, 但抗菌活性并不强; 但三种成分分别与硫酸阿米卡星联合用药后, 对多重耐药肺炎克雷伯菌显示了非常好的联合用药效果, 能产生明显的协同或相加作用, 尤其是盐酸巴马汀与阿米卡星联用的作用效果最佳。5 株已对阿米卡星(单药)表现为耐药的肺炎克雷伯菌, 在阿米卡星与巴马汀联用后对阿米卡星的 MIC 值降至 $16 \mu\text{g/ml}$ 及以下, 表现为敏感, 显示了非常好的联合用药效果和临床应用前景。

令人惊喜的是, 本研究中 177986 号为耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP), 盐酸巴马汀与阿米卡星联合用药后显示了出人意料的效果, 不仅产生了协同作用, 并且将其由耐药菌转变为敏感菌, 这种联合用药是否对其他 CRKP 同样具有逆转作用, 需要进一步的实验数据支持。

基金项目

江西省自然科学基金项目(编号: 20192BAB205106), 江西省 2020 年大学生创新创业训练计划项目(编

号: S202011843028)。

参考文献

- [1] 全国耐药细菌监测网. 全国细菌耐药监测网 2014-2019 年细菌耐药性监测报告[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1): 175-179.
- [2] Hickman, R.A., Hughes, D., Cars, T., Malmberg, C. and Cars, O. (2014) Cell-Wall-Inhibiting Antibiotic Combinations with Activity against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 267-273. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12374>
- [3] 徐安, 卓超, 苏丹虹, 等. 2005-2014 年 CHINET 克雷伯菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3): 267-274.
- [4] 彭少华, 李从荣, 施善玲. 产超广谱 β -内酰胺酶细菌的检测及耐药性观察[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(6): 350-362.
- [5] 宋晓蕾摘译, 王明贵审校. 预测产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌所致血流感染病死率的有关因素: 联合治疗的重要性[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(2): 141.
- [6] 覃容贵, 罗圣圣. 九头狮子草醇提物药效学的实验研究[J]. 中药材, 2006, 29(9): 961-963.
- [7] 刘平, 叶惠芬, 陈惠玲, 等. 5 种中药对产酶菌的抑菌作用[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(1): 39-40.
- [8] 边才苗, 杨云斌, 费杰, 等. 五味子提取物体外抑菌作用初探[J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(1): 122-123.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute (2020) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S30. CLSI, Wayne.
- [10] 吕娟, 谢芬, 丁永娟. 头孢他啶与中药制剂联合应用对铜绿假单胞菌的体外抗菌活性的研究[J]. 医学信息, 2015, 28(28): 48-49.
- [11] 陈美娟, 葛李, 顾立, 等. 银黄注射液体外抗菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 377-378.
- [12] 冯慧芬, 赵秋民, 段广才, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药性及其危险因素分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(7): 1325-1327.
- [13] 阮慧白, 谢锦荣, 周壮丽, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(23): 5818-5819.
- [14] 陈凡, 林敏, 胡述立, 等. 不同剂量替加环素治疗碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌医院获得性肺炎的有效性和安全性研究[J]. 中南药学, 2021, 19(8): 1729-1733.
- [15] 王耘, 胡凯文, 安超. 贝母素乙联合氨苄西林舒巴坦抗耐药菌感染的体内实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2010-2013.
- [16] 张伟, 包俊. 双黄连联合氯唑西林钠对金葡球菌耐药株的抗菌作用研究[J]. 中国中医药科技, 2013, 20(3): 245-246.
- [17] 梁彩倩, 张永标, 杨晓燕, 等. 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌氨基糖苷类耐药性及其修饰酶基因型的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(12): 2875-2877.
- [18] 王珊珊, 郭辉, 邱文生, 等. 我院产 ESBL 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌分布及耐药分析[J]. 青岛大学医学院学报, 2015, 51(3): 303-305.
- [19] 刘荣欣, 鲁改儒, 郭吉勇. 中药及其组方对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 2265-2267.
- [20] 周雪宁, 权志博, 王雷. 五倍子等 3 种中药体外抗产 ESBLs 大肠埃希菌研究及其探讨[J]. 陕西中医学院学报, 2009, 32(5): 80-81.
- [21] 帅丽华, 姜登钊, 刘怀, 等. 黄连成分与阿米卡星联合用药对多重耐药大肠埃希菌的体外活性研究[J]. 天津医药, 2016, 31(6): 50-52.