

# 木犀草素联合庆大霉素对耐药化脓隐秘杆菌抑制作用的研究

宋雪娇<sup>1</sup>,刘耀川<sup>1</sup>,高翔<sup>1</sup>,孙婷婷<sup>1</sup>,田春莲<sup>1</sup>,赵敬翠<sup>2</sup>,张德显<sup>1</sup>,刘明春<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院,沈阳 110866; 2. 建平县畜产品安全监督所,辽宁建平 122400)

[收稿日期] 2016-07-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0054-05 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 为探究木犀草素联合庆大霉素对耐药化脓隐秘杆菌的抑制作用,采用微量肉汤稀释法分别测定木犀草素和庆大霉素对 34 株化脓隐秘杆菌的最小抑菌浓度(MIC)。选取对庆大霉素耐药的化脓隐秘杆菌,通过棋盘法测定两种药物联合抑菌效果。经亚抑菌浓度木犀草素作用耐药菌株,比较木犀草素作用前后化脓隐秘杆菌对庆大霉素的耐药性变化情况。结果表明,木犀草素对化脓隐秘杆菌的 MIC 值为 39~156  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,与庆大霉素联合的作用为不相关;耐药菌经亚抑菌浓度木犀草素(1/4MIC)作用 36 h 后,庆大霉素对耐药菌的 MIC 值下降 2~32 倍,且原菌株耐药水平越高, MIC 下降倍数越高。提示木犀草素具有良好抗菌活性,且能够逆转化脓隐秘杆菌耐药性。

**[关键词]** 木犀草素;化脓隐秘杆菌;药物联合;抗菌作用;逆转耐药

## Study on Inhibiting Effects of Luteolin Combined with Gentamicin Against Drug-resistant *Trueperella pyogenes*

SONG Xue-jiao<sup>1</sup>, LIU Yao-chuan<sup>1</sup>, GAO Xiang<sup>1</sup>, SUN Ting-ting<sup>1</sup>, TIAN Chun-lian<sup>1</sup>, ZHAO Jing-cui<sup>2</sup>, ZHANG De-xian<sup>1</sup>, LIU Ming-chun<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Husbandary and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Jianping Supervision Institute of Animal Product Safety, Jianping, Liaoning 122400, China)

**Abstract:** To explore the antibacterial effects of luteolin combined with gentamicin, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of luteolin and gentamicin against 34 strains of *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) were tested by broth microdilution method. The gentamicin resistance isolates were selected to determine the co-antibacterial effects between luteolin and gentamicin by the chessboard method. The drug-resistant levels among these isolates were observed after treating with luteolin at a sub-inhibitory concentration. The results indicated that the MIC of luteolin ranged from 39 to 156  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , meanwhile there was no co-effects against *T. pyogenes* between luteolin and gentamicin. The MICs of these resistant isolates became 1/2 to 1/32 after treating 36 h with a sub-inhibitory concentration (1/4MIC) of luteolin, the MICs decreased significantly as the antibiotic resistant levels become higher.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201954、31572564)

作者简介: 宋雪娇, 硕士研究生, 从事兽医药理与毒理学方面研究。

通讯作者: 刘明春。liumingchun@sina.com.

The results show that luteolin has a good antibacterial activity and it can reverse the drug resistance of *T. pyogenes*.

**Key words:** luteolin; *T. pyogenes*; combination between antimicrobial agents; antibacterial effect; reversing drug resistance

近年来,细菌的耐药问题日趋严重,耐药水平越来越高,给养殖业发展造成极大困扰<sup>[1]</sup>。新型抗菌药物和逆转细菌耐药性药物制剂的研发已成为学者研究的热点。我国传统中药不但具有广谱抗菌作用,还能够逆转细菌耐药,可以减轻细菌的选择压力,从而不易产生耐药性<sup>[2]</sup>。木犀草素作为天然黄酮类化合物,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[3-5]</sup>。早在20世纪80年代,我国学者首次阐明仙鹤草提取物木犀草素-7-葡萄糖苷具有良好抗菌活性<sup>[6]</sup>,且随着木犀草素及其衍生物抗菌活性研究逐渐深入,越来越多相关报道表明木犀草素对多种耐药菌具有明显抑制作用,甚至逆转耐药菌对抗生素敏感性,如木犀草素不仅具有良好的抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)活性,还能够恢复耐药菌对青霉素的敏感性<sup>[7-8]</sup>。但目前尚未见有关木犀草素对化脓隐秘杆菌作用的报道,本试验主要探讨木犀草素对化脓隐秘杆菌的抑菌效果,及逆转化脓隐秘杆菌对庆大霉素的耐药性情况,以为木犀草素作为抗耐药菌新药的研发提供参考依据。

## 1 材料

1.1 菌株 34株奶牛子宫内膜炎化脓隐秘杆菌分离株(HC03-1、HC13-7、HCH03-3、HCH14-1、HCH02-2、BM04-2、QMC01-3、WBX02-1等)由本实验室分离鉴定并保存;化脓隐秘杆菌标准菌株(ATCC19411),美国标准菌种库。

1.2 抗菌药物 木犀草素(批号14100463),上海纯优生物科技有限公司;庆大霉素对照品(590 IU/mg),中国兽医药品监察所。

1.3 培养基及主要试剂 营养肉汤(NB)、MH琼脂培养基培养基,北京奥博星生物技术有限公司;TBD胎牛血清,天津灏洋生物科技制品有限责任公司。

1.4 主要仪器 超净工作台(苏州净化设备有

限公司);立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);气浴恒温振荡培养箱(常州国华电器有限公司)、隔水式电热恒温培养箱(上海博泰实验设备有限公司)、微量可调移液器(德国Eppendorf公司)。

## 2 方法

2.1 菌液制备 取实验室保存的试验菌株甘油菌接种于3 mL NB肉汤(含8% TBD胎牛血清)培养基中,在37℃、120 r/min恒温振荡箱中震荡培养18 h;划线接种到MH(A)血琼脂平板上,37℃倒置培养48 h。在平板上挑取单菌落,接种到NB肉汤中,37℃、120 rpm/min恒温振荡箱中震荡培养18 h,用麦氏比浊法调整菌液浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  CFU/mL。

2.2 药液制备 精确称量木犀草素、庆大霉素,并按照说明使用适当溶剂溶解,分别配制成终浓度为1000和1280 μg/mL的储存药液,分装,置于4℃保存备用。

2.3 MICs测定 以化脓隐秘杆菌标准株ATCC19411为质控菌株,采用微量肉汤稀释法分别测定木犀草素、庆大霉素对34株化脓隐秘杆菌分离株的MIC值,37℃培养24 h后能抑制细菌生长的最小药物浓度即为该药物对细菌的MIC值,每次试验重复3次,依据参考文献判断结果<sup>[9-10]</sup>。

2.4 两药联合对耐药菌株的药敏试验 以耐庆大霉素的化脓隐秘杆菌为受试菌株,采用微量棋盘稀释法测定木犀草素与庆大霉素的联合抑菌浓度,计算联合抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)。判定方法:FICI = (MICa联合/MICa单独) + (MICb联合/MICb单独), FICI ≤ 0.5,两者协同;0.5 < FICI ≤ 1,两者相加;1 < FICI ≤ 4,两者不相关;FICI > 4,两者拮抗<sup>[11-12]</sup>。

2.5 亚抑菌浓度木犀草素对耐药菌株耐药性的逆转作用 根据木犀草素对化脓隐秘杆菌MIC的测

定结果,将木犀草素配制成为低于 MIC 的不同浓度梯度药液,终浓度为对应菌株的 MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC、1/16MIC,37℃ 培养,分别于 18、24、30、36、42、48、54、60 h 取 100 μL 培养物接种于 NB 肉汤,37℃ 120 r/min 震荡培养 18 h,测定庆大霉素对该菌的 MIC 值<sup>[13-14]</sup>。针对木犀草素逆转耐药的菌株,进行五次传代,最后通过药敏试验比较庆大霉素对逆转耐药菌株传代前后的 MIC 值变化

情况<sup>[8]</sup>。

### 3 结果与分析

3.1 MICs 测定结果 木犀草素对化脓隐秘杆菌 ATCC19411 的 MIC 值为 78 μg/mL,对化脓隐秘杆菌分离株的 MIC 为 39~156 μg/mL。根据 CLSI 规定标准测定庆大霉素对 34 株化脓隐秘杆菌 MIC 结果显示,8 株分离菌株对庆大霉素产生耐药性,耐药率达 23.5%。测定结果见表 1。

表 1 木犀草素与庆大霉素对化脓隐秘杆菌的 MIC 测定结果

| 抗菌药物 | MIC 范围/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | ATCC19411 MIC/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 耐药临界点/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 耐药率/%      |
|------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------|
| 木犀草素 | 39~156                        | 78                                   | ---                          | 0(0/34)    |
| 庆大霉素 | 1~32                          | 1                                    | ≥4                           | 23.5(8/34) |

3.2 两药联合对耐药菌株药敏分析结果 木犀草素联合庆大霉素作用于化脓隐秘杆菌标准株

ATCC19411 和耐药菌株,FICI 范围在 1.125~4 之间,结果显示两者不相关,如表 2 所示。

表 2 木犀草素联合庆大霉素抗菌活性的测定结果

| 菌株        | 单独 MIC                      |                             | 联合 MIC                      |                             | FICI   | 效果  |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------|-----|
|           | 庆大霉素/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 木犀草素/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 庆大霉素/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 木犀草素/(μg·mL <sup>-1</sup> ) |        |     |
| HC03-1    | 32                          | 78                          | 64                          | 156                         | 4      | IND |
| HC13-7    | 32                          | 78                          | 2                           | 156                         | 2.0625 | IND |
| HCH03-3   | 32                          | 78                          | 32                          | 78                          | 2      | IND |
| HCH14-1   | 32                          | 39                          | 32                          | 78                          | 2      | IND |
| HCH02-2   | 32                          | 78                          | 32                          | 78                          | 2      | IND |
| BM04-2    | 4                           | 39                          | 4                           | 39                          | 2      | IND |
| QMC01-3   | 8                           | 78                          | 8                           | 78                          | 2      | IND |
| WBX02-1   | 16                          | 78                          | 2                           | 78                          | 1.125  | IND |
| ATCC19411 | 1                           | 78                          | 1                           | 78                          | 2      | IND |

FICI = (MICa 联合/MICa 单独) + (MICb 联合/MICb 单独), FICI = 0.5, 两者协同 (SYN); 0.5 < FICI ≤ 1, 两者相加 1 < FICI ≤ 4, 两者不相关 (IND); FICI > 4, 两者拮抗 (ANT)。

3.3 木犀草素对耐药菌株的逆转作用结果 通过对木犀草素不同作用时间和不同浓度下,耐药菌株恢复对庆大霉素敏感性的情况,得到木犀草素对耐药菌株的最佳逆转条件,如表 3 所示。经过 MIC 亚抑菌浓

度木犀草素作用后,可使化脓隐秘杆菌耐药菌株变得相对敏感,其中 5 株对庆大霉素耐药的菌株经木犀草素作用后 MIC 值均不同程度下降,且原耐药菌耐药水平越高,庆大霉素对细菌 MIC 值下降越多。

表 3 亚抑菌浓度木犀草素作用后庆大霉素对菌株的 MIC 变化情况

| 抗菌药物      | 条件                          | 菌株      |         |        |         |         |
|-----------|-----------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
|           |                             | HCH03-3 | HCH02-2 | BM04-2 | QMC01-3 | WBX02-1 |
| 木犀草素      | 作用浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 20      | 20      | 10     | 20      | 20      |
|           | 作用时间/h                      | 36      | 36      | 36     | 36      | 36      |
| 庆大霉素      | 作用浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 32      | 32      | 4      | 8       | 16      |
|           | 作用时间/h                      | 1       | 4       | 2      | 2       | 4       |
| MIC 值下降倍数 |                             | 32      | 8       | 2      | 4       | 4       |

度木犀草素逆转耐药菌株经传代五次后对庆大霉素药敏试验结果显示,5 株逆转耐药菌株中有 2 株原高度耐药菌 MIC 值恢复到药物作用前,3 株仍

保持相对敏感性,说明逆转耐药菌株传代后耐药性不稳定。木犀草素作用前、作用后及传代后,庆大霉素对耐药菌的 MIC 值比较结果如图 1 所示。

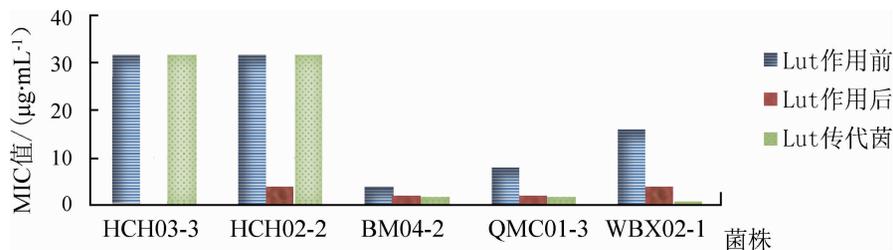


图1 木犀草素作用前后庆大霉素对菌株 MIC 值比较

## 4 讨论与小结

4.1 木犀草素抗菌作用 有关木犀草素抗菌作用方面的报道越来越多,如木犀草素对金黄色葡萄球菌、念珠菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌均具有良好的抑制效果<sup>[16-17]</sup>。据文献报道,木犀草素对金黄色葡萄球菌具有较强的抑菌活性(MIC = 90 µg/mL),且随着木犀草素浓度增加,其抗菌活性随之增强,它是通过抑制 DNA 拓扑异构酶的活性进而阻止了相关蛋白的表达,影响菌体正常的生理功能,最终抑制细菌生长<sup>[10,15]</sup>。本研究表明木犀草素对化脓性链球菌具有较强的体外抗菌活性,其对 34 株化脓性链球菌 MIC 值为 39 ~ 156 µg/mL,且对耐抗生素的菌株亦有良好的抗菌作用。

4.2 木犀草素联合庆大霉素抗菌作用 临床上常考虑采用联合用药,治疗耐药菌引起的混合感染、重症感染,这样不仅能提高疗效、降低毒性,还能延缓甚至避免细菌耐药性的产生。本研究结果表明,木犀草素与庆大霉素联合作用于耐药化脓性链球菌,FCI 范围在 1.125 ~ 4 之间,说明两种药物不相关,联合使用不能增强抗耐药化脓性链球菌效果。但据张新娟<sup>[18]</sup>报道,木犀草素与喹诺酮类和氨基糖苷类药物联用对 MRSA 具协同抑菌作用。木犀草素与头孢他啶联合使用,在治疗产 β - 内酰胺酶化脓性链球菌感染方面具有极大潜力,其可能的机制有三种:抑制肽聚糖的合成、增加细胞膜渗透性、降低核酸含量<sup>[19]</sup>。上述差异可能与药物种类以及受试菌属不同有一定的关系。

4.3 木犀草素逆转细菌耐药作用 据报道,经亚抑菌浓度木犀草素作用于耐药金黄色葡萄球菌 24 h 后,能够恢复青霉素对耐药菌的敏感性,其机制是抑制细菌 β - 内酰胺酶活性<sup>[8]</sup>。木犀草素不仅能够抑制耐阿莫西林大肠杆菌,而且与阿莫西林联用能够逆转大肠杆菌对阿莫西林的耐药性<sup>[20]</sup>。本研究发现,经木犀草素作用后,耐药化脓性链

菌可不同程度恢复对庆大霉素的敏感性,且随着原耐药菌耐药水平越高,庆大霉素对细菌 MIC 值下降越多。但逆转菌株经传代后对庆大霉素的敏感性不太稳定。综上所述,木犀草素的确具有较好的抗菌活性,可以缓解细菌耐药性增长,在生产实践中有一定的意义,但有关木犀草素对耐药化脓性链球菌的逆转耐药作用的机制有待进一步探究。

## 参考文献:

- [1] 杨雨辉,卢彤岩,赵丽荣. 抗菌药物使用对耐药菌富集影响的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2013,47(5):58-61.
- [2] 盘红梅,廖泽勇,李舒,等. 中药抗耐药菌的研究进展[J]. 临床医药文献杂志,2015,2(32):6755-6756.
- [3] Skariyachan S, Jayaprakash N, Bharadwaj N, et al. Exploring insights for virulent gene inhibition of multidrug resistant *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, and *Staphylococcus aureus* by potential phytochemicals via in silico screening [J]. Biomolecular Structure and Dynamics, 2014;32(9):1379-1395.
- [4] Jeon I H, Kim H S, Kanq H J, et al. Anti-inflammatory and antipruritic effects of luteolin from perilla (*P. frutescens* L.) leaves [J]. Molecules, 2014, 19(6):6941-6951.
- [5] Laura M, Elisa M M, Claudio J V, et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Anti-microbial Properties[EB/OL]. doi:10.1155/2015/905215, 2015.
- [6] 苏广双,苏世文,朱廷儒. 仙鹤草抗菌活性成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报,1984,(1):44-48.
- [7] Xu H X, Lee S F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria[J]. Phytotherapy Research, 2001, 15(1):39-43.
- [8] 刘立新,高月林,王朝兴等. 黄酮化合物对金黄色葡萄球菌 β - 内酰胺酶活性影响[J]. 东北农业大学学报,2013,44(3):119-122.
- [9] Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty - Second Informational Supplement (M100 - S22) [S].
- [10] 王倩,谢明杰. 木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及其机制[J]. 微生物学报,2010,50(9):1180-1184.
- [11] 宋晓言,赵晴,田立杰,等. 30 味中药提取物与环丙沙星联用对猪源链球菌体外抑菌作用研究[J]. 中国兽药杂志,2014, 48(3):62-65.

# 氟苯尼考在红笛鲷体内的药代动力学研究

黄郁葱<sup>1,2</sup>, 汤菊芬<sup>1,2</sup>, 秦青英<sup>1,2</sup>, 简纪常<sup>1,2</sup>\*, 黄月雄<sup>1,2</sup>, 廖建萌<sup>3</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088;

2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东湛江 524088;

3. 广东省湛江市食品药品监督管理局, 广东湛江 524022)

[收稿日期] 2016-07-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0058-07 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 为研究氟苯尼考在红笛鲷体内的药代动力学特征,在水温(20±2)℃条件下,氟苯尼考以 10 mg/kg 单剂量腹注和口灌健康红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*),采用 HPLC-MS/MS 测定组织中的药物浓度,数据用 DAS3.0 软件分析。结果显示,两种给药方式下红笛鲷血浆药时数据均符合一级吸收二室模型;腹注给药后血浆、肝脏、肾脏和肌肉的峰浓度( $C_{max}$ )分别为 10.62 μg/mL、8.36、22.57 和 4.76 μg/g,达峰时间( $T_{max}$ )分别为 1.2、1.0、1.0 和 6.0 h,消除半衰期( $t_{1/2\beta}$ )分别为 29.76、17.84、17.23 和 19.48 h;口灌给药后血浆、肝脏、肾脏和肌肉的  $C_{max}$  分别为 2.35 μg/mL、1.45 μg/g、4.06 μg/g 和 1.73 μg/g,  $T_{max}$  分别为 2.69、1.5、1.5 和 4.0 h,  $t_{1/2\beta}$  分别为 40.59、12.29、37.78 和 47.34 h。结果表明,腹注给药方式下氟苯尼考在红笛鲷体内的吸收快于口灌给药,在血浆和肝脏中的消除快于口灌给药,在肌肉和肾脏中的消除则慢于口灌给药。研究结果为氟苯尼考在临床上的合理应用提供了科学依据。

**[关键词]** 氟苯尼考;红笛鲷;药代动力学

**基金项目:** 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201203085)

**作者简介:** 黄郁葱,从事水产动物病害防治方面研究。

**通讯作者:** 简纪常。E-mail: jianjc@gmail.com

[12] 管翠萍,冯磊,乔霞,等. 不同中药提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用和逆转机制[J]. 中国兽医学报, 2015,35(12):1997-2001.

[13] 杨聪. 苦豆子碱对耐药性大肠杆菌 PBP3 及 I 类整合子作用的研究[D], 2013, 宁夏大学.

[14] 潘杰,苗霞,刘启波,等. 12 味中药配方颗粒体外逆转临床常见细菌的耐药性[J]. 四川中医, 2016, 34(4): 123-125.

[15] 周建新,林姣,包月红,等. 不同溶剂及辅助方法对花生壳提取物中木犀草素含量及抗菌作用的影响[J]. 中国粮油学报, 2014,29(9):89-90.

[16] Khaled N R, Ana Ćirić, Jasmina G, et al. Antimicrobial activity, growth inhibition of human tumour cell lines, and phytochemical characterization of the hydromethanolic extract obtained from *sapindussaponaria* L. Aerial Parts[J]. BioMed Research International [EB/OL]. doi:10.1155/2013/659183, 2013.

[17] Ricardo S A, Graciela G G, Jonathan P M, et al. Activity of polyphenolic compounds against *candida glabrata* [J]. Molecules, 2015, 20(10):17903-17912.

[18] 张新娟,左国营,王涛,等. 木犀草素与抗菌药体外联用抗耐甲氧西林金葡菌的作用研究[J]. 药学进展, 2012,36(4):173-179.

[19] Siri Wong S, Thumanu K, Henggratom T, et al. Synergy and mode of action of ceftazidime plus quercetin or luteolin on *Streptococcus pyogenes* [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015:759459.

[20] Eumkeb G, Siri Wong S, Thumanu K. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action [J]. Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2012, 117:247-253.