

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.09.04

P10B 抗菌肽和硫酸小檗碱对肉鸡源大肠杆菌的体外联合抗菌作用研究

范学政¹, 马 健², 陶庆树², 刁有江^{2*}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 山东农业工程学院, 济南 25000)

[收稿日期] 2018-01-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 09-0022-05 [中图分类号] S859.796

[摘 要] 为了解 P10B 抗菌肽与硫酸小檗碱联合抗菌作用, 进行 P10B 抗菌肽与硫酸小檗碱联用的体外抑菌试验。试验菌株为 20 株肉鸡源大肠杆菌菌株。采用微量肉汤稀释法测定 P10B 与硫酸小檗碱对大肠杆菌的最低抑菌浓度; 棋盘稀释法测定两个药的分级抑菌浓度指数, 判断联合抗菌效果。结果表明, 在联合药敏试验中, 两药呈协同作用的占 10%, 呈相加作用的占 85%, 呈无关作用的占 5%。平均分级抑菌浓度指数为 0.825, 两种药联和用药效应主要表现为累加作用。

[关键词] 抗菌肽; 硫酸小檗碱; 联合用药

Research on the Antibacterial Effects of Berberine Sulfate Combined with Antibacterial Peptide P10B against *Escherichia coli* from Broilers *in vitro*

FAN Xue-zheng¹, MA Jian², TAO Qing-shu², DIAO You-jiang²

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Shandong Agriculture and Engineering University, Jinan 250100, China)

Corresponding author: DIAO You-jiang, E-mail: diaoyoujiang@163.com

Abstract: To study the antibacterial effects of berberine sulfate combined with antibacterial peptide P10B, antimicrobial susceptibility of berberine sulfate combined with P10B against *Escherichia coli* from broilers were determined *in vitro*. 20 strains of *E. coli* were isolated from broilers. Antimicrobial susceptibility of berberine sulfate and P10B against *E. coli* from broilers was determined by broth microdilution assay respectively, and synergistic effects of the combination of berberine sulfate with P10B against pathogenic *E. coli* were evaluated by checkerboard microdilution assay, expressed as fractional inhibitory concentration (FIC) index. The results of checkerboard tests showed that the synergic effects of the combination were 10%, and that additive effects were 85%, and that the indifferent interactions were 5%, and that the average value of FIC indexes was 0.825, indicating additive effects of berberine sulfate combined with P10B on *E. coli*.

Key words: antibacterial peptide; berberine sulfate; drug combination

基金项目: 山东省博士基金资助项目 (BS2010NY025)

作者简介: 范学政, 博士, 从事预防兽医学研究。

通讯作者: 刁有江。E-mail: diaoyoujiang@163.com

鸡大肠杆菌病是由某些致病性大肠杆菌引起的鸡的传染病的总称^[1]。鸡大肠杆菌感染是规模化饲养场的常见病,是引起肉鸡细菌性感染的主要致病因素。近年来,随着抗生素的大量使用,大肠杆菌对传统抗菌药的耐药现象和抗菌药物残留问题日渐严峻,促使人们寻找抗生素的替代品^[2]。微生物天然产物以其来源广泛、不易产生耐药性和绿色安全等特点而备受关注。抗菌肽是一类具有抗菌活性的新型抗菌药,一般由几十个氨基酸残基组成,不仅具有广谱的抗菌作用,而且不易产生耐药性,是抗生素的理想替代品^[3]。P10B 抗菌肽是针对大肠杆菌筛选得到的一个肽类先导化合物,初步试验发现其对大肠杆菌具有良好的抗菌作用。小檗碱是黄连、黄柏中的主要抗菌活性成分,常用来治疗细菌性肠炎^[4]。与临床常用的盐酸小檗碱相比,硫酸小檗碱的研究文献较少,小檗碱硫酸盐水溶性较高,更适合制成水溶性制剂,方便临床应用。本文拟通过对 P10B 抗菌短肽和硫酸小檗碱对大肠杆菌的体外联合抗菌作用进行研究,评价两种抗菌药的联合用药效果,以期为兽医临床新型复方抗菌制剂的开发提供科学依据。

1 材 料

1.1 供试药品 抗菌肽 P10B,氨基酸序列为 QKRPRVRLSA,分子量为 1210.46,含量 95%,样品编号 CL-2482,由上海强耀生物科技有限公司合成;硫酸小檗碱,含量 95%,批号 20170306,由济南美事达兽药有限公司提供;硫酸庆大霉素,含量为 630 IU/mg,批号 130326-201015,购自中国食品药品检定研究院。

1.2 受试菌株 大肠杆菌肉鸡源临床分离株 20 株,由山东农业工程学院兽医药理与毒理实验室提供。

1.3 质控菌株 大肠杆菌标准菌株 ATCC25922,购自中国食品药品检定研究院。

1.4 培养基和试剂 MH 肉汤培养基、LB 肉汤培养基、麦康凯培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司;磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钙、氯化钠等试剂购自天津科密欧化学试剂有限公司。各种培

养基按文献^[5]进行配制,其中 MH 肉汤按正常使用浓度的单倍和双倍两种规格配制成阳离子调节的 MH 肉汤培养基^[6]。

2 方 法

2.1 药物储备液的配制及保存 根据预试验,称取适量硫酸小檗碱,加入灭菌蒸馏水,制成浓度为 4096 $\mu\text{g/mL}$ 的硫酸小檗碱溶液;称取适量 P10B 抗菌肽,加入灭菌蒸馏水,制成浓度为 5120 $\mu\text{g/mL}$ 的 P10B 抗菌肽溶液;两种溶液分别用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,制成抗菌储备液。抗菌储备液无菌分装后,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。庆大霉素,用灭菌蒸馏水溶解,得到浓度为 1280 IU/mL 的庆大霉素抗菌储备液。

2.2 菌悬液的制备 取纯化的大肠杆菌单个菌落,接种到 LB 液体培养基,过夜培养后,转接到单倍 MH 肉汤培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,200 r/min 振荡培养至对数生长期。取待测菌 0.5 mL,装入测试管,在 600 nm 波长下测定菌液 OD 值。以单倍 MH 肉汤为对照,用单倍 MH 肉汤调整 OD 值为 0.08~0.1,得到浓度约为 10^8 CFU/mL 的菌悬液^[7],再用单倍 MH 肉汤将待测菌浓度调整为 1×10^6 CFU/mL,备用。

2.3 单个抗菌药对大肠杆菌的最小抑制浓度 (MIC) 的确定 参考 CLSI 抗菌药物敏感试验执行标准^[6],采用微量肉汤稀释法对大肠杆菌分离株进行药物敏感性检测,并以大肠杆菌 ATCC25922 为质控菌株,CLSI 质控参数中没有给出硫酸小檗碱的判定标准,在此以庆大霉素作为质控用药。每个测试单元体系为 200 μL ,其中包括抗菌药测试液 50 μL 、双倍 MH 肉汤 50 μL 、菌悬液 100 μL 。硫酸小檗碱、P10B、庆大霉素的最高测试液浓度分别为 1024 $\mu\text{g/mL}$ 、128 $\mu\text{g/mL}$ 和 32 IU/mL。根据预试验,各药测试液浓度,以两倍的级差递减,得到 10 个浓度梯度。

取灭菌 96 孔 U 型板,无菌条件下,每排第一孔分别加入抗菌药工作液 100 μL ,硫酸小檗碱、P10B、庆大霉素的工作液浓度分别为 4096 $\mu\text{g/mL}$ 、512 $\mu\text{g/mL}$ 和 128 IU/mL。然后,在每排第二孔至第十孔,分别加入灭菌蒸馏水 50 μL 。从第一孔吸

取药液 50 μL , 加至第二孔, 吹打混匀后, 从第二孔吸取混和液 50 μL , 加至第三孔, 依次倍比稀释至第十孔, 从第十孔中吸取 50 μL 弃去。从第一孔到第十孔, 分别加入 2 倍 MH 肉汤培养基 50 μL , 在第十一孔加入单倍 MH 肉汤培养基 200 μL 。从第一孔到第十孔, 分别加入已经调整浓度的菌悬液 100 μL , 在第十二孔加菌悬液和单倍 MH 肉汤各 100 μL 。密封 96 孔板, 震荡混匀后, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱内培养 20 h 后观察并记录结果。每个试验重复三次, 同时设立质控菌 ATCC25922 对照。

2.4 联合药敏试验 根据单药 MIC 试验结果, 按 2 倍逐级递减, 以 MH 肉汤为稀释液, 分别制备 $4 \times \text{MIC} \sim 1/16 \times \text{MIC}$ 7 种工作浓度的硫酸小檗碱和 P10B 抗菌液, 将两药各浓度组成 7×7 方阵, 联合用药。取灭菌 96 孔板, 沿纵列, 浓度由低至高, 分别从第七列至第一列加入硫酸小檗碱抗菌液, 每孔各加 50 μL ; 沿横排, 浓度由低到高, 分别从第七排至第一排加入 P10B 抗菌液, 每孔各加 50 μL ^[8]。 7×7 方阵中每孔各加菌液 100 μL 。纵向第八列, 从上至下, 7 孔只加单倍肉汤 200 μL 作为空白对照; 横向第八排, 从左向右, 7 孔各加菌液和单倍肉汤 100 μL , 作为菌液生长对照。将 96 孔板密封, 震荡混匀后, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱内培养 20 h 后观察并记录结果。每个试验重复三次, 同时设立质控菌 ATCC25922 对照。

2.5 结果判定

2.5.1 MIC 结果判定 当质控菌大肠杆菌 ATCC25922 的测试参数最低抑菌浓度在质控范围内时, 肉眼观察能完全抑制孔内大肠杆菌生长的最小的抗菌药物浓度, 即为该药的 MIC^[7]。当出现跳孔时, 按参考文献^[8]进行处理。

2.5.2 分级抑菌浓度 (FIC) 指数的结果判定^[9]

$\text{FIC 指数} = \text{MIC}_{\text{小檗碱联合}} / \text{MIC}_{\text{小檗碱单用}} + \text{MIC}_{\text{P10B联合}} / \text{MIC}_{\text{P10B单用}}$, 当 FIC 指数 ≤ 0.5 判为协同作用; 当该指数为 $0.5 \sim 1$, 判为相加作用; 当该指数为 $1 \sim 2$ 判为无关作用; 当该指数 > 2 , 判为拮抗作用。

3 结果与分析

3.1 单个抗菌药对大肠杆菌的药敏试验 结果如

表 1 所示, 硫酸小檗碱对不同大肠杆菌临床分离株的 MIC 范围为 $128 \sim 1024 \mu\text{g/mL}$, 以 MIC 512 $\mu\text{g/mL}$ 居多, MIC 平均值为 531.2 $\mu\text{g/mL}$ 。P10B 对不同大肠杆菌临床分离株的 MIC 范围为 $8 \sim 32 \mu\text{g/mL}$, 以 MIC 16 $\mu\text{g/mL}$ 居多, MIC 平均值为 17.2 $\mu\text{g/mL}$ 。质控菌 ATCC25922 的测定结果在质控范围内, 说明药物敏感性检测结果可靠。

3.2 联合用药药敏试验结果 硫酸小檗碱与抗菌肽 P10B 对大肠杆菌的联合药敏试验结果见表 1。在联合药敏试验中, 两药联用呈协同作用的占 10%, 呈相加作用的占 85%, 呈无关作用的占 5%。平均分级抑菌浓度指数为 0.825, 说明两种药联用时, 药物效应主要表现为累加作用。质控菌 ATCC25922 的测定结果在质控范围内, 说明药物敏感性检测结果可靠。

4 讨论

本研究以临床分离的肉鸡源大肠杆菌为抑制对象, 检测了植物源抗菌药物硫酸小檗碱与抗菌肽先导化合物 P10B 单用时的 MIC 及联合使用时的 FIC 指数。

硫酸小檗碱对大肠杆菌临床分离株的 MIC 以 512 $\mu\text{g/mL}$ 为主, 说明硫酸小檗碱对大肠杆菌的抗菌作用为抑菌作用。这与袁敏等对盐酸小檗碱的检测结果相吻合^[10]。小檗碱是来源于植物的异喹啉类生物碱。在自然界中, 天然产物往往对革兰氏阳性菌的抗菌作用明显。魏常志等研究发现小檗碱对金黄色葡萄球菌的抗菌强度最高^[11]。硫酸小檗碱对大肠杆菌临床分离株的 MIC 值较高, 这可能与大肠杆菌等革兰氏阴性菌的外部结构有关, 小檗碱的脂溶性较差, 从而导致小檗碱不易进入大肠杆菌细胞内^[12]。小檗碱口服吸收差, 对大肠杆菌肠毒素引起的分泌性腹泻具有良好的治疗作用^[13]。在兽医临床上, 硫酸小檗碱更适合开发为治疗肠道感染的药物。

抗菌肽先导化合物 P10B 对大肠杆菌临床分离株的 MIC 以 16 $\mu\text{g/mL}$ 为主, 初步显示了对禽源致病性大肠杆菌良好的抗菌作用。提示 P10B 具有开发为新型抗大肠杆菌感染药物的潜力。抗菌肽是

生物体内广泛存在的抗菌活性物质,不易产生耐药性,在细菌耐药和多重耐药问题日益严峻的今天,抗菌肽已成为兽医临床上抵抗细菌性感染的重要的潜在候选药物^[14]。在硫酸小檗碱与 P10B 对大肠杆菌的联合药敏试验中,平均分级抑菌浓度指数为 0.825,说明两种药在体外联用时药效增强,主要表现为累加作用。两药联用时的 MIC 均有不同程

度的下降,无拮抗现象,提高了抗菌效能。有益的联合用药可以增强药物效应,提高临床疗效,降低副作用,延缓耐药性的产生^[15]。本试验的检测结果提示,在临床上解决禽大肠杆菌肠道感染时,硫酸小檗碱与 P10B 组合可能是一种有效的联合用药方式。

表 1 硫酸小檗碱与 P10B 单用和联用时有对大肠杆菌的体外抗菌作用结果

Tab 1 The antibacterial effects <i>in vitro</i> of berberine sulfate combined with antibacterial peptide P10B against <i>E.coli</i>						
菌号 number	小檗碱 Berberine		P10B		FIC 指数 FIC index	结果 Result
	单用 MIC *	联用 MIC *	单用 MIC *	联用 MIC *		
1	512	128	32	16	0.75	相加
2	256	64	32	8	0.5	协同
3	512	128	16	8	0.75	相加
4	256	128	32	16	1	相加
5	1024	512	32	8	0.75	相加
6	256	128	16	4	0.75	相加
7	512	256	8	4	1	相加
8	512	128	16	8	0.75	相加
9	1024	512	8	4	1	相加
10	1024	512	16	4	0.75	相加
11	512	256	16	4	0.75	相加
12	512	256	16	4	0.75	相加
13	256	128	16	4	0.75	相加
14	512	256	8	4	1	相加
15	1024	256	16	4	0.5	相加
16	512	256	8	8	1.5	无关
17	512	256	16	4	0.75	相加
18	256	128	8	4	1	相加
19	512	256	16	4	0.75	相加
20	128	64	16	4	0.75	相加

* MIC 单位:μg/mL

5 结 论

硫酸小檗碱对肉鸡源大肠杆菌的抗菌作用,主要为抑菌作用;P10B 对肉鸡源大肠杆菌的抗菌作用较强。P10B 抗菌肽与硫酸小檗碱联合用药对肉鸡源大肠杆菌的抗菌效应主要表现为累加作用。本研究为新型复方抗菌制剂的开发提供了初步的理论基础。

参考文献:

[1] 刁有江, 范学政. 山东省部分地区禽源致病性大肠杆菌的血清流行病学调查与耐药性检测[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(2):14-19.

Diao Y J, Fan X Zh. Investigation on Predominant Serotypes and Antimicrobial Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Some Regions in Shandong Province[J]. Chin J Vet Drug, 2014, 48(2):14-19.

- [2] Thomas P. Van Boeckel, Emma E. Glennon, Dora Chen, *et al.* Reducing Antimicrobial Use in Food Animals [J]. Science, 2017, 357(6358):1350-1352.
- [3] Da Costa, J. P., Cova, M., Ferreira, R., *et al.* Antimicrobial Peptides: an Alternative for Innovative Medicines? [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(5):2023-2040.
- [4] 付 华. 福氏志贺菌转录谱在抗菌药物作用机制研究中的应用[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2008.
Fu H. Study on Molecular Mechanism of Antimicrobials by *Shigella flexneri* Transcriptional Profiles [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2008.
- [5] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd Edition [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [6] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Edition. CLSI Supplement M100 [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- [7] 张 箬, 赵俊杰, 李运喜, 等. 微量肉汤稀释法药敏试验的误差分析[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(11):858-864.
Zhang Zh, Zhao J J, Li Y X, *et al.* The Testing Errors of Broth Microdilution Methods for the Antimicrobial Susceptibility Testing [J]. Chin J Antibio, 2016, 41(11):858-864.
- [8] 李 兰, 何家康, 汤树生, 等. 阿莫西林与硫酸粘菌素联合抗菌活性的研究[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(10):91-93.
Li L, He J K, Tang Sh Sh, *et al.* Study on the Combined Antibacterial Activity of Amoxicillin and Colistin Sulfate [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2010, 46(10):91-93.
- [9] 刘运平, 操继跃, 王春梅, 等. 阿米卡星与甲氧苄啶的体外联合抑菌研究[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(7):515-518.
Liu Y P, Cao J Y, Wang Chunmei, *et al.* Antibacterial Effect of Concurrent Use of Amikacin and Trimethoprim *in vitro* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(7):515-518.
- [10] 袁 敏, 杜茂鑫, 马红伟, 等. 盐酸小檗碱和硫酸粘菌素对大肠杆菌和沙门氏菌的体外联合抗菌作用[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(5):85-87.
Yuan Min, Du Maixin, Ma Hongwei, *et al.* Combined Antibac-
- terial Effects of Berberine Hydrochloride and Colistin Sulfate on *Escherichia coli* and *Salmonella in vitro* [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010, 42(5):85-87.
- [11] 魏长志, 田素青. 治痢片体外抗菌实验[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(3):167-168.
Wei Changzhi, Tian Suqing. Antibacterial Test of Anti-dysentery Tablets *in vitro* [J]. Chin J Hosp Pharm, 2002, 22(3):167-168.
- [12] 李慧玉, 王玉刚, 袁桂漪, 等. 小檗碱对大肠杆菌基因转录抑制作用的实验研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(4):569-577.
Li Huiyu, Wang Yugang, Yuan Zhiyi, *et al.* Experimental Study on Inhibition Effect of Berberine in *Escherichia coli* Gene Transcription [J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2017, 19(4):569-577.
- [13] 钟慈平, 蹇 宇, 舒 畅, 等. 小檗碱及其衍生物抑菌作用研究进展[J]. 食品学, 2013, 34(7):321-325.
Zhong Ciping, Qian Yu, Shu Chang, *et al.* Research Progress in Antimicrobial Effects of Berberine and Its Derivatives [J]. Food Science, 2013, 34(7):321-325.
- [14] 黄海凤, 缙三虎, 马银云, 等. 抗菌肽在细菌感染动物模型中的抗菌活性和毒性评价方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2016, 37(3):103-108.
Huang Haifeng, Gou Sanhu, Ma Yinyun, *et al.* Progress on Activity and Toxicity Evaluation of Antimicrobial Peptides in Animal Models of Bacterial infections [J]. Progress In Veterinary Medicine, 2016, 37(3):103-108.
- [15] 李 赛, 唐建华, 吴俊伟, 等. 硫酸粘菌素联合多种抗菌药物对大肠杆菌的抑菌试验[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(12):71-72.
Li Sai, Tang Jianhua, Wu Junwei, *et al.* Bacteriostasis Test of Colistin Sulfate Combined with Multiple Antibacterials on *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 45(12):71-72.

(编辑:侯向辉)