

## 黄芩苷对一株产 NDM-1 大肠埃希菌体内外抗菌作用的研究\*

刘志远, 潘 健, 齐 杰, 张婷菊, 马玉芝 (中国中医科学院广安门医院检验科, 北京 100053)

**摘要:**目的 观察黄芩苷对产 NDM-1 大肠埃希菌的体内外抗菌作用。方法 肉汤稀释法测定黄芩苷的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC);棋盘联合药敏试验检测黄芩苷与亚胺培南的协同作用;通过小鼠菌血症模型,观察黄芩苷对感染模型的保护作用。结果 黄芩苷的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度相同,均为 8 mg/ml;黄芩苷与亚胺培南呈明显的协同作用(FIC=0.125),单独使用黄芩苷使菌血症小鼠死亡率降低 25%。结论 黄芩苷体内、外均具有一定的抗产 NDM-1 大肠埃希菌活性。

**关键词:**黄芩苷;大肠埃希菌;NDM-1 金属酶;抗菌作用

中图分类号:R378.21;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)03-124-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.035

### Anti-bacterial Effects of Baicalin on One *Escherichia coli* Strain Carrying NDM-1 Gene

LIU Zhi-yuan, PAN Jian, QI Jie, ZHANG Ting-ju, MA Yu-zhi

(Department of Clinical Laboratory, Guanganmen Hospital,  
China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China)

**Abstract:** **Objective** To examine the bacteriostasis of baicalin against *Escherichia coli* strain carrying NDM-1 gene. **Methods** Minimal inhibitory concentration(MIC) and minimal bactericidal concentration(MBC) were determined by broth dilution method. Synergy function was designed with checkerboard method. Anti-infection effect in vivo of baicalin was observed in mice with bacteremia. **Results** In vitro antibacterial tests showed that the MIC and MBC baicalin were 8 mg/ml. Synergistic inhibitory effect was observed between baicalin and imipenem (FIC=0.125). In vivo inhibition experiments showed that baicalin had decreased the mortality of 25% of *Escherichia coli* Strain carrying NDM-1 gene infection in mice. **Conclusion** Baicalin has antibacterial effect on NDM-1 *E. coli*.

**Keywords:** baicalin; *Escherichia coli*; NDM-1; anti-bacterial effects

1 型新德里金属蛋白酶(new delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1, NDM-1)是一种金属  $\beta$  内酰胺酶,携带此酶的菌株对青霉素类、头孢菌素类、头霉素类等  $\beta$  内酰胺类和碳青霉烯类抗生素均耐药,其基因可在不同菌种间传递,从而令含有这种酶的细菌具有广泛耐药性<sup>[1]</sup>。携带 NDM-1 基因的大肠埃希菌等革兰阴性杆菌引起血液、尿路、伤口、肺部和导管相关感染等,其产生的广泛耐药性给临床治疗带来很大的困难。黄芩苷是从清热解毒类中药黄芩的根中提取的黄酮类物质,是黄芩发挥药效最重要的成分<sup>[2]</sup>,有一定抗菌作用<sup>[3]</sup>。本研究观察了黄芩苷对广安门医院分离的一株产 NDM-1 大肠埃希菌的体内外抗菌效果。

#### 1 材料与方法

1.1 研究对象 产 NDM-1 大肠埃希菌分离自广安门医院检验科,对临床常用碳青霉烯类、 $\beta$ -内酰

胺类、 $\beta$ -内酰胺类/酶抑制剂、喹诺酮类、氨基糖苷类、磺胺类全部耐药。

#### 1.2 方法

1.2.1 试剂:黄芩苷购自日本 TCI 公司,亚胺培南购自默沙东公司,高活性干酵母购自安琪酵母股份有限公司。

1.2.2 实验动物:SD 小鼠(18~22g)由广安门医院实验动物中心提供。

1.2.3 最小抑菌浓度(MIC):以能抑制细菌生长的最低浓度为 MIC。将黄芩苷以灭菌 MH 肉汤倍比稀释 32,16,... 0.25 mg/ml 8 个浓度,加 200  $\mu$ l 于 96 孔板,加菌液至最终菌液浓度  $5 \times 10^5$  CFU/ml,放置在微量震荡仪震荡 3 min,35℃ 过夜培养<sup>[4]</sup>。

1.2.4 联合药敏试验:将黄芩苷以灭菌 MH 肉汤倍比稀释 16,8,... 0.25 mg/ml 7 个浓度和亚胺培

\* 基金项目:国家中医临床研究示范基地科研专项暨所级科研基金课题(2011S242)。

作者简介:刘志远(1978-),男,硕士,主要从事细菌耐药机制及中药抗感染研究,Tel:(010)88001460,E-mail:593793204@qq.com。

南以灭菌 MH 肉汤倍比稀释成 128, 64, ..., 0.125  $\mu\text{g/ml}$  11 个浓度, 将配好不同浓度的 2 种抗菌药物按棋盘法设计, 两两组合加入 96 孔平板中, 每种抗菌药物加 100  $\mu\text{l}$ , 加菌液至最终菌液浓度  $5 \times 10^5$  CFU/ml, 放置在微量震荡仪震荡 3 h, 35 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。观察结果, 记录单独应用两药的最低抑菌浓度  $\text{MIC}_A$  和  $\text{MIC}_B$ , 并选择最佳组合效应时两药联合时各自的  $\text{MIC}_A + \text{MIC}_B$ , 计算部分抑菌浓度 (FIC) 指数。FIC 指数 =  $\text{MIC}_A$  药联用 /  $\text{MIC}_A$  药单用 +  $\text{MIC}_B$  药联用 /  $\text{MIC}_B$  药单用。FIC 指数  $\leq 0.5$ , 协同作用;  $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ , 相加作用;  $1 < \text{FIC} \leq 2$ , 无关作用;  $\text{FIC} > 2$ , 拮抗作用。

1.2.5 最小杀菌浓度检测 (MBC): 以无细菌生长的最小浓度为 MBC。将黄芩苷以灭菌 MH 肉汤倍比稀释 16, 8, ..., 0.25 mg/ml 7 个浓度, 加 200  $\mu\text{l}$  于 96 孔板, 加菌液至最终菌液浓度  $5 \times 10^5$  CFU/ml, 放置在微量震荡仪震荡 3 min, 35 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。每孔取菌液, 划线法接种于血平板。

1.2.6 大肠埃希菌 BJ-01 对小鼠的最小致死量 (MLD): 20 只 SD 小鼠, 雌雄各半, 随机分成 5 组, 每组 4 只。1~4 组分别尾静脉注射用 5 g/dl 干酵母液稀释的产 NDM-1 大肠埃希菌菌液, 对照组注射生理盐水。分别记录 24, 48 h 死亡情况, 2 天内感染动物全部死亡的剂量为最小致死量。

1.2.7 黄芩苷对菌血症小鼠的治疗作用: 16 只 SD 小鼠 18~22 g, 雌雄各半, 以 2 天内感染动物全部死亡的最小致死量 (100% MLD) 作为感染菌量。造模 30 min 内给药治疗, 黄芩苷治疗组 (8 只): 尾静脉注射黄芩苷 500 mg/kg 体重, 空白对照组 (8 只): 注射同体积的生理盐水。24 h 后第二次给药, 方案同前, 48 h 记录小鼠存活情况。

## 2 结果

2.1 最小抑菌浓度 经微量稀释法测得黄芩苷对 BJ-01 的最小抑菌浓度为 8 mg/ml。

2.2 联合药敏试验  $\text{FIC} = 0.5/8 + 0.5/8 = 0.125$ , 具有明显协同作用, 见图 1。

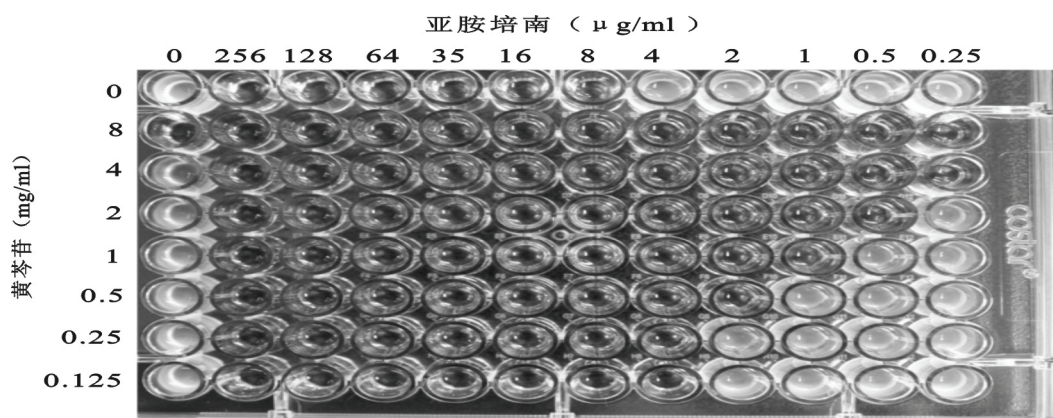


图1 黄芩苷与亚胺培南联合药敏试验

2.3 最小杀菌浓度检测 (MBC) 黄芩苷对 BJ-01 的 MBC 与 MIC 相同, 均为 8 mg/ml。

2.4 最小致死量 大肠埃希菌 BJ-01 对小鼠的最小致死量为  $6 \times 10^8$  CFU/ml。

2.5 黄芩苷对菌血症小鼠的治疗效果观察 对照组全部死亡, 黄芩苷治疗组存活 2 只, 存活率 25%。

3 讨论 肠杆菌科细菌是临床常见的条件致病菌, 随着碳青霉烯类抗菌药物临床用量的不断增长, 对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率亦逐年上升。碳青霉烯酶是引起碳青霉烯类耐药的主要原因, 而 NDM-1 型碳青霉烯酶是不被  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂抑制, 能灭活青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物, 产 NDM-1 超级细菌同时也对其他临床抗菌药物呈现交叉耐药<sup>[5]</sup>, 对临床感染性疾病的治疗

构成强大挑战<sup>[6]</sup>。黄芩苷 (Baicalin, 分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ ) 是从黄芩根中提取分离出来的一种黄酮类化合物, 具有显著的生物活性, 实验表明, 黄芩苷可通过破坏菌体生物膜, 抑制细菌 DNA, RNA, 蛋白质合成, 降解内毒素等多方面起到抗菌作用。本研究发现黄芩苷对产 NDM-1 的大肠埃希菌具有明显的抑菌、杀菌作用, 且最小抑菌浓度和最小杀菌浓度相同, 均为 8 mg/ml。联合药敏试验显示黄芩苷与亚胺培南呈明显的协同作用 ( $\text{FIC} = 0.125$ ), 亚胺培南的 MIC 从 8  $\mu\text{g/ml}$  降到了 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 黄芩苷与亚胺培南能否在体内起到协同作用有待进一步观察。体内动物试验中, 单独使用黄芩苷治疗使菌血症小鼠死亡率较对照组降低了 25%, 起到了一定程度的保护作用。

体内外试验均证实了黄芩苷对产 NDM-1 大

肠埃希菌具有抗菌作用,具有临床应用前景。在目前细菌耐药形势严峻,抗生素开发面临瓶颈的情况下,利用中药的丰富资源,积极研究中药的抗菌抗感染作用,充分发挥中药与抗生素的互补作用,可为临床治疗超级细菌感染开辟新的途径。

#### 参考文献:

- [1] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(10): 597-602.
- [2] Lai MY, Hsiu SL, Tsai SY, et al. Comparison of metabolic pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(2): 205-209.
- [3] 施高翔,邵 菁,汪天明,等. 黄芩及其有效成分抗菌作用新进展[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(19): 3713-3718.  
Shi GX, Shao J, Wang TM, et al. New advance in studies on antimicrobial activity of scutellaria baicalensis and its effective ingredients [J]. *China Journal of Chinese Meteria Medica*, 2014, 39(19): 3713-3718.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty First informational supplement [S]. Wayne, Pa, CLSI M100-S11.
- [5] 邹明祥, 邹靖敏, 李 军, 等. 产 NDM-1 肺炎克雷伯菌中国分离株的初步研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(8): 616-621.  
Zou MX, Wu JM, Li J, et al. NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in mainland China [J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2012, 14(8): 616-621.
- [6] 宁明哲, 张之烽, 周万青, 等. 耐亚胺培南的肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因检测及其同源性分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(2): 58-59, 63.  
Ning MZ, Zhang ZF, Zhou WQ, et al. Carbapenemase gene detection and homology analysis of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Mod Lab Med*, 2014, 29(2): 58-59, 63.

收稿日期: 2015-09-09

修回日期: 2015-12-24

(上接 123 页)

- Wei GY. Thalassaemia parents psychological health survey [J]. *Guangxi Medicine Journal*, 2012, 34(8): 1066-1067.
- [8] 马升俊, 肖永君. 广西南宁市婚检人群珠蛋白生成障碍性贫血筛查现状分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2012, 27(2): 96-98.  
Ma SJ, Xiao YJ. Status analysis of the globin generation anemia screening for check-ups crowd Guangxi Nanning [J]. *J Mod Lab Med*, 2012, 27(2): 96-98.
- [9] Georgel AF, Mereau C, Willekens S, et al. Identification of a new mutation on the beta-globin gene; codons 8/9 (+ AGAA); GAG. AAG. TCT (Glu-Lys-Ser) > GAG. AAAGAAG, in a patient from the north of France with a phenotype of beta-thalassaemia minor [J]. *Hemoglobin*, 2010, 34(4): 389-393.
- [10] 黄盛芳, 罗盛娟, 阮铮艳, 等. 贵州省都匀市布依族中学生地中海贫血基因携带率调查 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2015, 23(10): 667-669.  
Huang CF, Luo CJ, Ruan ZY, et al. Research on the rate of thalassaemia gene carrying in the middle school students of Bouyei nationality in Douyun city of Guizhou province [J]. *Chinese Journal of Family Planning*, 2015, 23(10): 667-669.
- [11] 杜 丽, 尹爱华, 张 彦, 等. 2 171 例地中海贫血产前基因诊断回顾性分析 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2012, 39(2): 208-210.  
Du L, Yin AH, Zhang Y, et al. Prenatal diagnosis of thalassaemia in 2 171 cases [J]. *J Int Obstet Gynecol*, 2012, 39(2): 208-210.
- [12] 李佩芳, 庞文正. 珠海地区 635 例地中海贫血基因检测结果分析 [J]. *中国实用医药*, 2015, 10(25): 17-19.  
Li PF, Pang WZ. Analysis of gene detection results of 635 thalassemia cases in Zhuhai area [J]. *China Prac Med*, 2015, 10(25): 17-19.
- [13] 褚玉新, 王晓春, 胡朝晖, 等. 广东省  $\beta$ -地中海贫血基因突变类型研究 [J]. *中国地方病学杂志*, 2010, 29(2): 162-166.  
Chu YX, Wang XC, Hu ZH, et al. Analysis of  $\beta$ -thalassaemia mutations in Guangdong province [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2010, 29(2): 162-166.
- [14] 田文芳, 唐喜军, 易素芬, 等. 广东省珠海地区  $\alpha$ -和  $\beta$ -地中海贫血基因突变类型研究 [J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(12): 1487-1488.  
Tian WF, Tang XJ, Yi SF, et al. Guangdong Zhuhai region of alpha and beta thalassaemia gene mutation type research [J]. *Laboratory Medicine and Clinical*, 2011, 8(12): 1487-1488.
- [15] 喻 芳, 钟春琍, 周 强, 等. 贵州少数民族地区  $\beta$ -地中海贫血的分子流行病学研究 [J]. *中华医学遗传杂志*, 2010, 27(6): 700-703.  
Yu F, Zhong CL, Zhou Q, et al. Genetic analysis of  $\beta$ -thalassaemia mutations in the minority population of Guizhou province [J]. *Chin J Med Genet*, 2010, 27(6): 700-703.

收稿日期: 2016-01-16

修回日期: 2016-02-28