

鱼腥草联合亚胺培南对碳青霉烯耐药铜绿假单胞菌杀菌效果的体外研究

黄秋兰^{1a}, 钱巧慧², 范德平^{1a}, 刘红绸^{1a}, 薛娜丽^{1a}, 高守霞^{1a}, 马莹玮^{1a}, 周嘉平^{1b}

(1.上海市嘉定区南翔医院 a. 检验科;b. 中医科, 上海 201802; 2. 上海健康医学院附属周浦医院教学培训部, 上海 201318)

摘要:目的 探究鱼腥草联合亚胺培南对碳青霉烯耐药铜绿假单胞菌(carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*, CRPA)的体外杀菌效果, 为合理使用抗生素、预防和控制医院感染提供参考。方法 样本取自上海市某医院收治患者送检的痰、尿、创面等液体标本中分离到的50株CRPA, 观察单药使用亚胺培南、鱼腥草及二者联合使用时对铜绿假单胞菌(PA)的最低抑菌浓度(MIC)、分级抑菌浓度(FIC)指数和对浮游菌的时间杀菌曲线。结果 亚胺培南单用的MIC₅₀(32 mg/L)和MIC₉₀(128 mg/L)均高于鱼腥草单用(MIC₅₀2 mg/L, MIC₉₀4 mg/L)及两者联合使用(MIC₅₀0.25 mg/L, MIC₉₀1 mg/L), 且鱼腥草单用的MIC₅₀和MIC₉₀均高于两者联合使用。分级抑菌浓度指数显示12株(24.0%)亚胺培南和鱼腥草联用后呈现协同作用, 30株(60.0%)表现相加作用, 8株(16.0%)表现无相关作用, 未发现拮抗作用。随机选取2株菌株观察浮游菌的时间杀菌曲线, 单独使用亚胺培南6~12h后, 菌株均出现细菌恢复生长的现象; 鱼腥草联合亚胺培南使用时, 菌株的浮游菌数量降低均> 6log CFU/L, 且24h时均无细菌生长现象。结论 鱼腥草联合亚胺培南优于单药亚胺培南的抗CRPA效率。

关键词:铜绿假单胞菌; 亚胺培南; 鱼腥草; 最低抑菌浓度

中图分类号: R378.991; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2021)03-118-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.03.027

Vitro Study on the Bactericidal Effect of Houttuynia Cordata Combined with Imipenem Against Carbapenem Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*

HUANG Qiu-lan^{1a}, QIAN Qiao-hui², FAN De-ping^{1a}, LIU Hong-chou^{1a}, XUE Na-li^{1a}, GAO Shou-xia^{1a},
MA Ying-wei^{1a}, ZHOU Jia-ping^{1b}

(1a. Department of Clinical Laboratory; 1b. Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Jiading District Nanxiang Hospital, Shanghai 201802, China; 2. Department of Teaching & Training, Shanghai Health and Science School Affiliated Zhoupu Hospital, Shanghai 201318, China)

Abstract: Objective To explore the bactericidal effect in vitro of houttuynia cordata combined with imipenem on Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) for the rational use of antibiotics, prevention and control of nosocomial infections. **Methods** Fifty CRPA strains isolated from liquid specimens such as sputum, urine, and wounds of patients from Shanghai, were collected from January 2019 to March 2020. The minimum inhibitory concentration (MIC), partial inhibitory concentration index (FIC), and time sterilization curve for planktonic bacteria of imipenem, houttuynia cordata alone and the combination of both were analyzed. **Results** The MIC₅₀ and MIC₉₀ of imipenem alone (MIC₅₀ 32 mg/L, MIC₉₀ 128 mg/L) were higher than those of houttuynia cordata single-use (MIC₅₀ 1 mg/L, MIC₉₀ 4 mg/L) and the combination of imipenem and houttuynia cordata (MIC₅₀ 0.25 mg/L, MIC₉₀ 1 mg/L), and the MIC₅₀ and MIC₉₀ of houttuynia cordata alone were higher than that of imipenem. The hierarchical inhibitory concentration index showed that 12 (24.0%) strains of imipenem combined with Houttuynia cordata showed synergistic effect, 30 strains (60.0%) showed additive effect, 8 strains (16.0%) showed no correlation effect, and no antagonistic effect was found. Two strains were randomly selected to observe the time sterilization curve of planktonic bacteria. It was found that the number of planktonic bacteria was less than 6 log CFU/L after 24h, and there was no bactericidal effect. After using imipenem alone for 6~12h, the bacteria resumed growth was showed. When houttuynia cordata combined with imipenem was used, the number of planktonic bacteria decreased by more than 6 log CFU/L, and there was no bacterial growth at 24 hours. **Conclusion** The anti CRPA efficiency of Houttuynia cordata combined with imipenem was better than that of single drug imipenem.

基金项目:上海市嘉定区科学技术委员会基金(JDKW-2018-W18)。

作者简介:黄秋兰(1976-),女,副主任技师,主要从事多重耐药菌研究, E-mail: huang15821947258@126.com。

通讯作者:周嘉平, E-mail: huhua021@126.com。

Keywords: *pseudomonas aeruginosa*; imipenem; houttuynia cordata; minimum inhibitory concentration

铜绿假单胞菌 (*pseudomonas aeruginosa*, PA) 是目前院内感染的最重要条件致病菌之一, 随着临床碳青霉烯类药物的广泛应用, 耐碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌 (carbapenem-resistant *pseudomonas aeruginosa*, CRPA) 逐年增多, 相关感染患者的死亡率呈逐年上升趋势^[1]。近年世界卫生组织 (WHO) 报告也指出耐碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌已是最致命的病原菌之一, 临床为控制相关感染迫切需要合理使用有效的抗生素和治疗方法^[2-4]。

但是现有抗 CRPA 感染药物, 如抗菌肽、铁螯合物等, 均未广泛应用于临床, 同时新型抗生素研发也需要一个长期的过程。中医药治疗临床感染性疾病已历史久远, 目前有近百种较为常用的抗菌中草药。鱼腥草味辛, 性微寒, 可清热解毒、消痈排脓、利尿通淋, 既往多用于治疗肺痈吐脓、痰热喘咳等。现代科学研究表明鱼腥草含有抑菌成分, 具有抑菌作用, 可用于治疗呼吸道感染、结膜炎等炎症性疾病^[5-6]。本研究旨在分析鱼腥草联合亚胺培南对 CRPA 的体外杀菌效果, 为合理使用抗生素、预防和控制医院感染提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 从2018年1月~2020年3月上海市某医院收治的患者采集痰、尿、创面等液体标本, 对分离到的50株CRPA进行研究, 所有菌株均经Vitek2Compact全自动细菌鉴定药敏仪 (生物梅里埃公司, 法国) 鉴定, 剔除来源同一患者的重复菌株。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器: Vitek2Compact, 酶标仪 (SMMk3), 微量移液器, 生物安全柜, 96孔平底组织培养板, 电子分析天平。

1.2.2 试剂: ①注射用亚胺培南-西司他丁钠 (默沙东公司, 批号: S041089, 规格: 亚胺培南500mg和西司他丁钠500mg/瓶)。将蒸馏水作为溶剂, 无菌条件下配置128U/ml亚胺培南原液, 即每瓶注射用亚胺培南西司他丁钠用1 953.13ml无菌注射用水溶解, 并贮存于4℃冰箱中备用。②鱼腥草标准品 (上海诗丹德标准技术服务有限公司, 纯度99.8%, 批号: 6858, 规格: 20mg/瓶)。无菌操作下用无菌注射用水作溶剂, 配制1 024 μg/ml的鱼腥草原液。

1.2.3 CRPA悬液的制备: 使用液体培养法制备, 在基础琼脂培养基的平板上对CRPA传代2~3次, 确保其保持良好的生长状态。使用接种环在无菌条件下取一环菌落, 将其接种在4~5ml的MH肉汤培养液内, 恒温培养箱内培养4~6h (35℃)。使用生理盐水校正浓度至0.5麦氏比浊标准, 将悬液

进行1:100稀释, 15min内接种, 此时含菌量约为 1.5×10^6 CFU/ml。

1.3 方法

1.3.1 最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定: 50株CRPA使用微量肉汤稀释法测定MIC值, 将鱼腥草素钠原液及亚胺培南原液使用试管倍比稀释法制备成一系列的浓度稀释液。制备菌悬液, 50 μl/孔进行接种, 同时设置阴性与阳性对照。做3个重复, 恒温培养箱内培养16~18h后观察, 无细菌生长且孔内澄清即为MIC。

1.3.2 联合抑菌效应判断: 通过棋盘稀释法测定分级抑菌浓度 (fractional inhibitory concentration, FIC) 指数。分别以两药MIC的2倍为最高稀释浓度, 按试管倍比稀释法纵横加25 μl入无菌96孔板内, 每孔中可得到不同浓度组合的两种抗生素混合液。再制备CRPA悬液, 在15 min内将制备好的菌液每孔50 μl加入孔内, 此时每孔最终接种菌量约为 5×10^5 CFU/ml, 设置药物单独抗菌试验对照、阴性对照和阳性对照, 置35℃培养16~18h后观察结果。试验重复3次。孔内澄清无细菌生长的最低药物浓度, 使用棋盘稀释法测试并计算FIC指数, 由联合MIC和单测MIC应用公式计算FIC指数: $FIC \text{ 指数} = A \text{ 药联合时的 MIC} / A \text{ 药单测 MIC} + B \text{ 药联合时的 MIC} / B \text{ 药单测 MIC}$ 。并依据以下标准来判断两药联合的抗菌作用: IC指数<0.5为协同作用; 0.5~1为相加作用; 1~2为无相关作用; >2为拮抗作用。

1.3.3 浮游菌时间杀菌曲线: 随机选取2株敏感菌株, 在含有 1×10^9 CFU/L浮游菌的肉汤内加入鱼腥草、亚胺培南或鱼腥草及亚胺培南, 其终浓度分别为16, 4和2mg/L, 并设置空白对照组, 37℃下振荡培养。在各时间点分别取样100 μl进行平板菌落计数。杀菌效应: 24h时细菌数量降低 $\geq 6 \log$ CFU/L。

1.4 统计学分析 采用WHONET 6.0软件和SPSS 22.0统计软件进行数据分析, 计数资料采用率 (%) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 亚胺培南、鱼腥草单用与联用对CRPA的MIC 见表1。对50株CRPA进行测定, 亚胺培南单用的MIC₅₀和MIC₉₀均高于鱼腥草单用及亚胺培南和鱼腥草联合使用, 且鱼腥草单用的MIC₅₀和MIC₉₀均高于亚胺培南和鱼腥草联合使用。

2.2 亚胺培南和鱼腥草联用对CRPA的FIC 50株测试菌株, 其中12 (24.0%) 菌株亚胺培南和鱼腥草联用后FIC结果为<0.5, 呈现协同作用; 30株 (60.0%) FIC结果为0.5~1.0, 表现为相加作用; 8

株(16.0%)FIC结果为1.0~2.0,表现为无相关作用;未发现菌株FIC结果表现为拮抗作用。

表1 亚胺培南、鱼腥草单用和联用对CRPA的MIC(mg/L)

药 物	MIC ₅₀	MIC ₉₀
亚胺培南	32	128
鱼腥草	2	4
亚胺培南+鱼腥草	0.25	1

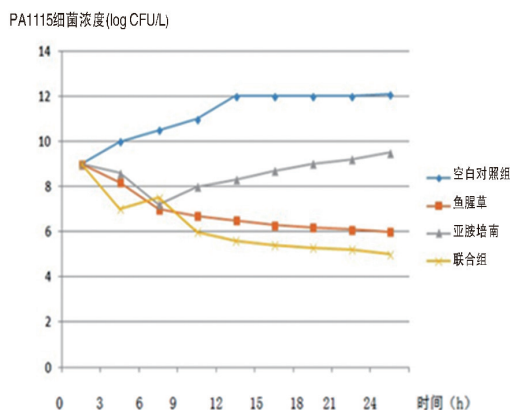


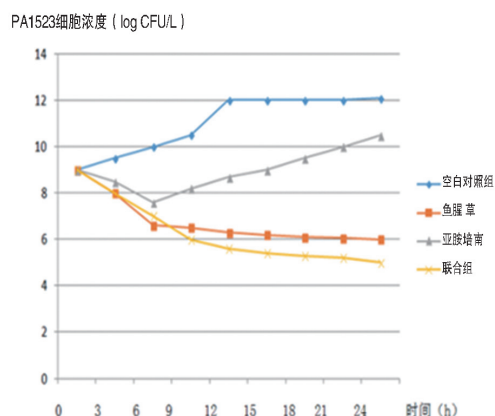
图1 亚胺培南、鱼腥草单用和联用对CRPA浮游菌的时间杀菌曲线

3 讨论

PA极易出现耐药,且耐药机制十分复杂,即使部分菌株是初次分离的敏感菌株,在用抗生素治疗3~4天后即可发生耐药^[7-8]。临床分离到的CRPA菌株,往往同时对氨基苷类、氟喹诺酮类以及β-内酰胺类等抗生素耐药,尽管多黏菌素可能是目前对CRPA最为有效的抗生素之一,但是其毒副作用大,临床较少使用;替加环素是耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染的首选,但对CRPA无抗菌活性。新型抗生素的研发是克服CRPA耐药性的有效途径,但新药开发周期长、投资大,短期内也无新药可用于临床抗感染治疗。

中医药治疗临床感染性疾病已历史久远,目前有近百种较为常用的抗菌中草药,因而从中草药中去筛选对铜绿假单胞菌具有较强抗菌活性的药物或相关成分可能有助于CRPA感染的治疗。近年有研究通过筛查12种中药对铜绿假单胞菌的体外抗菌活性,进一步发现鱼腥草具有体外抑制铜绿假单胞菌的活性^[9]。然而CRPA具有广泛耐药的特性,单一的中药抑制其活性作用有限,本研究旨在分析亚胺培南作为临床一线用药抗多重耐药PA感染理论上,联合鱼腥草在体外抗CRPA的活性。研究结果显示亚胺培南单用的MIC均高于鱼腥草单用及亚胺培南和鱼腥草联合使用,且鱼腥草单用的MIC₅₀和MIC₉₀均高于亚胺培南和鱼腥草联合使用。通过对CRPA的MIC值分析,本研究同时也证明鱼腥草对CRPA具有一定的抑菌活性。

2.3 亚胺培南、鱼腥草单用和联用对浮游菌的时间杀菌曲线 随机选取2株菌株观察,发现24h后浮游菌数量均<6log CFU/L,提示无杀菌效果。单独使用亚胺培南6~12h后,菌株均出现细菌恢复生长的现象。鱼腥草联合亚胺培南使用时,菌株的浮游菌数量降低均>6log CFU/L,且24h时均无细菌生长现象,见图1。



为进一步分析鱼腥草和亚胺培南体外联合抑菌效应,本研究通过棋盘稀释法测定分级抑菌浓度对50株CRPA进行了检测。结果发现鱼腥草和亚胺培南联用后,测试菌株主要呈现协同作用和相加作用,未发现菌株FIC结果表现为拮抗作用。已有研究发现由于中药药性平和,毒副作用小且不易产生耐药性,与西药联用可增强疗效^[10]。基于该研究理论,本研究结论也进一步显示鱼腥草和亚胺培南联用可增强CRPA的抑菌效率。

为从时间维度验证鱼腥草和亚胺培南对CRPA的体外抑菌效率,本研究最后通过随机选取2株菌株观察对浮游菌的时间杀菌曲线。结果发现单独使用亚胺培南6~12h后,菌株均出现细菌恢复生长的现象,而鱼腥草联合亚胺培南使用时,菌株的浮游菌数量明显降低,且24h时无细菌生长现象。该结果进一步说明了鱼腥草联合亚胺培南抗PA时较不易发生耐药,具有较佳的协同抗菌作用。

对于鱼腥草抑制铜绿假单胞菌作用机制,包括抑制LasA蛋白酶的活性^[11]、调控细胞因子mRNA的表达^[12]以及消除生物膜的屏障^[13]等,本研究并未在分子水平进行相关标志物表达的检测,同时鱼腥草的体外抑菌效率有待在动物水平进一步验证。

参考文献:

- [1] 严育忠,范惠清,郑文龙,等.改良亚胺培南-EDTA纸片增效试验检测铜绿假单胞菌产金属酶表型[J].检验医学,2014,29(1):65-68.
YAN Yuzhong, FAN Huiqing, ZHENG Wenlong, et al. The phenotypic detection of metallo-beta-lact-

- amase-producing *Pseudomonas aeruginosa* by modified imipenem-EDTA disk potentiation test [J]. Laboratory Medicine, 2014,29 (1): 65-68.
- [2] RELEASE N. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed[J]. Neurosciences, 2017, 22(2):159-160.
- [3] WILLYARD C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats[J]. Nature, 2017, 543(7643): 15.
- [4] 龚文波, 何林, 李勇, 等. 不同标本分离的铜绿假单胞菌对 12 种常用抗生素耐药性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2003, 18(3): 36-37.
- GONG Wenbo, HE Lin, LI Yong, et al. Analysis of drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different specimens to 12 common antibiotics [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2003, 18(3): 36-37.
- [5] 徐未芳, 展俊岭, 祝敏, 等. 鱼腥草抑菌作用研究进展 [J]. 绿色科技, 2019(2):135-137.
- XU Weifang, ZHAN Junling, ZHU Min, et al. Research advancement of heartleaf houttuynia herb on bacteriostatic action[J]. Green Technology, 2019(2):135-137.
- [6] 于立婷, 金毅, 杨莉萍, 等. 鱼腥草抗炎药理作用的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35 (17): 1935-1938.
- YU Liting, JIN Yi, YANG Liping, et al. Research situation of the anti-inflammatory pharmacological effects of Houttuynia cordata Thunb [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2019, 35 (17): 1935-1938.
- [7] CHAKRABORTY P, DASTIDAR D G, PAUL P, et al. Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by caffeine: a potential approach for sustainable management of biofilm[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(6): 623-635.
- [8] 冯群岭, 张建芳, 樊新, 等. 碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌外排泵表达研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23 (2): 107-109.
- FENG Qunling, ZHANG Jianfang, FAN Xin, et al. Research of carbapenems resistant mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2008, 23 (2): 107-109.
- [9] 高贵阳, 黄志昂, 黄晓辉, 等. 鱼腥草等 12 种中药对铜绿假单胞菌的体外抗菌活性研究 [J]. 中医临床研究, 2019, 11 (13): 18-21.
- GAO Guiyang, HUANG Zhiang, HUANG Xiaohui, et al. The bacteriostatic effect of 12 kinds of TCM medicines such as Yuxingcao on *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2019, 11 (13): 18-21.
- [10] 赵丽芳, 李建军. 不同用药方案治疗黏液型铜绿假单胞菌的临床效果 [J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2019, 46(3):204-207.
- ZHAO Lifang, LI Jianjun. Clinical analysis on different prescriptions for mucoid *Pseudomonas aeruginosa* [J]. International Journal of Epidemiology and Infectious Disease, 2019, 46 (3): 204-207
- [11] 王宁, 庞剑. 鱼腥草药理作用及对细菌耐药性的研究进程 [J]. 中医临床研究, 2017, 9 (17): 146-148.
- WANG Ning, PANG Jian. A review on pharmacological action and resistance to bacteria of houttuynia cordata [J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2017, 9 (17): 146-148.
- [12] 蒋跃平, 陈章义, 刘敏, 等. 鱼腥草中抗血栓活性生物碱成分的虚拟筛选 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8):1623-1634.
- JIANG Yueping, CHEN Zhangyi, LIU Min, et al. Virtual screening of antithrombotic alkaloids from Houttuynia cordata [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44 (8): 1623-1634.
- [13] 张译如, 杨雪莹, 李慧玲, 等. 某医院近三年铜绿假单胞菌耐药性的变迁分析 [J]. 黑龙江医药科学, 2019, 42 (4): 67-68.
- ZHANG Yiru, YANG Xueying, LI Huiling, et al. Analysis of drug resistance changes of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital in recent three years [J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2019, 42 (4): 67-68.

收稿日期: 2020-11-19 修回日期: 2021-01-25

(上接第 112 页)

- [12] 王宏, 叶琴, 陆琳, 等. WS/T 405-2012 血细胞分析参考区间 [J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(1):62-63.
- WANG Hong, YE Qin, LU Lin, et al. Reference interval for blood cell analysis of WS/T 405-2012[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2015, 38(1):62-63.
- [13] 陈龙梅, 杨振华. 上海市宝山区中年人群红细胞参数参考区间的建立 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17 (8): 1033-1035, 1039.
- CHEN Longmei, YANG Zhenhua. Establishment of reference interval for erythrocyte parameters among middle-aged people in Baoshan area in Shanghai [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2020, 17(8):1033-1035, 1039.
- [14] 魏容, 肖光军, 刘艳婷, 等. 四川遂宁地区表观健康成年人群外周血 NLR 参考区间的建立 [J]. 现代临床医学, 2020, 46(6):408-410, 416.
- WEI Rong, XIAO Guangjun, LIU Yanting, et al. Establishment of NLR reference interval in peripheral blood of apparent healthy adults in Suining area, Sichuan Province [J]. Journal of Modern Clinical Medicine, 2020, 46(6):408-410, 416.
- [15] 黄欣雨, 肖光军, 刘艳婷, 等. 遂宁地区表观健康成人静脉血血小板相关参数参考区间的建立 [J]. 现代临床医学, 2020, 46(6):404-407.
- HUANG Xinyu, XIAO Guangjun, LIU Yanting, et al. Establishment of reference interval of platelet related parameters in venous blood of healthy adults in Suining area [J]. Journal of Modern Clinical Medicine, 2020, 46(6):404-407.
- [16] GRIFFITHS J K, ILES T C, KODUAH M, et al. Centile charts II: alternative nonparametric approach for establishing time-specific reference centiles and assessment of the sample size required[J]. Clinical Chemistry, 2004, 50(5): 907-914.

收稿日期: 2020-04-21 修回日期: 2021-01-05