

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.08.004

3种中药活性成分对耐多药鲍曼不动杆菌的体外抑菌作用

陈佳,江雅琴,李伟,王艳平[△]

(湖南省湘潭市中心医院药学部,湖南湘潭 411100)

摘要:目的 观察丁香酚、姜黄素、大蒜素对耐多药鲍曼不动杆菌(MDR-Ab)的体外抑制作用。方法 使用MICROScan WalkAway-40型全自动微生物分析仪进行细菌学鉴定和药物敏感性试验,按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS/CLSI)2015年版标准判断结果,共分离鉴定42株MDR-Ab;采用微量肉汤稀释法分别测定丁香酚、姜黄素、大蒜素溶液对MDR-Ab的最低抑菌浓度(MIC),计算50%最低抑菌浓度(MIC₅₀)和90%最低抑菌浓度(MIC₉₀)。结果 丁香酚、姜黄素和大蒜素的MIC分别为32~256,1 024,64~1 024 μg/mL, MIC₅₀分别为128,1 024,512 μg/mL, MIC₉₀分别为256,0,1 024 μg/mL。结论 3种中药活性成分均对MDR-Ab有体外抑制作用,其中丁香酚抑制作用最强。

关键词:丁香酚;姜黄素;大蒜素;耐多药鲍曼不动杆菌;体外抑菌

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)08-0012-03

Bacteriostasis Effects of Active Ingredients of 3 Kinds of Traditional Chinese Medicine on Multidrug Resistant *Acinetobacter Baumannii* in Vitro

Chen Jia, Jiang Yaqin, Li Wei, Wang Yanping

(Department of Pharmacy, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan, Hunan, China 411100)

Abstract: Objective To investigate the bacteriostasis effects of eugenol, curcumin and allicin on multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*(MDR-Ab) in vitro. **Methods** The MicroScan WalkAway-40 automatic microorganism analyzer was used for bacteriological identification and susceptibility test, the standards of the National Committee for Clinical Laboratory Standards/ Clinical and Laboratory Standards Institute(NCCLS/CLSI) in 2015 was used for judging the results, 42 strains of MDR-Ab were isolated and identified. The minimum inhibitory concentration(MIC) of eugenol, curcumin and allicin solution to MDR-Ab was measured by broth microdilution method, and MIC₅₀ and MIC₉₀ were calculated. **Results** The MIC of eugenol, curcumin and allicin was 32-256, 1 024, 64-1 024 μg/mL, MIC₅₀ was 128, 1 024, 512 μg/mL, and MIC₉₀ was 256, 0, 1 024 μg/mL. **Conclusion** The active ingredients of 3 kinds of traditional Chinese medicine have bacteriostasis effect on MDR-Ab in vitro, in which the bacteriostasis effect of eugenol is the best.

Key words: eugenol; curcumin; allicin; multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*; in vitro bacteriostasis effect

鲍曼不动杆菌为非发酵条件致病菌,广泛存在于自然环境中,可引起肺炎、尿路感染、伤口感染等。随着抗菌药物的广泛使用,鲍曼不动杆菌(Ab)的耐药问题也日益突出,卫生部全国细菌耐药监测(Mohnarin,由全国84家医院参与)结果显示,鲍曼不动杆菌的多药耐药和泛耐药菌株比例高达53.8%^[1],其对青霉素类、头孢菌素类药物的耐药率已达63.0%~89.9%,对氨基苷类、喹诺酮类等抗菌药物的耐药率高达88.6%^[2],对曾为治疗鲍曼不动杆菌“金牌药物”的碳青霉烯类耐药率也超过60%。目前,多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-Ab)感染率迅猛上升,成为微生物学、流行病学及临床药学共同面临的难题。近代研究发现,许多中药如丁香、姜黄、大蒜有良好的广谱抗菌作用,而关于其主要成分丁香酚、姜黄素、大蒜素的抑菌活性亦有报道^[3-5]。由于这3种中药活性成分完全不同的化学结构和抗菌机制,有可能绕过Ab的耐药机制而缓解耐药。为此,本研究中

考察了这3种成分体外抑制MDR-Ab活性的效果,以期筛选出有活性的天然化合物。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株来源:42株MDR-Ab来自于我院2016年3月至2017年5月门诊及住院患者的各种标本,包括痰液24株,创面分泌物12株,尿液3株,腹腔积液2株,脑脊液1株(1个患者1株)。

仪器:MICROScan WalkAway-40型全自动微生物分析仪(Dade Behring公司);Spectra MaxM5型酶标仪(Molecular Devices公司),HF safe操作安全柜,恒温培养箱,冰箱,干热灭菌器,试管,移液枪等。

试剂:MH培养基及有关试剂(杭州天和生物技术有限公司);药敏纸片(北京天坛药物生物技术开发公司);96孔板(Costar公司);丁香酚(批号为Z110725,纯度≥98%),大蒜素(批号为100384,纯度≥98%),姜黄

第一作者:陈佳(1988-),女,汉族,硕士研究生,初级药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)93532267@qq.com。

[△]通信作者:王艳平(1983-),女,汉族,硕士研究生,副主任药师,研究方向为临床药学和中药调剂,(电子信箱)wangyanping2001@163.com。

素(批号为 ZT-20112, 纯度 $\geq 98\%$), 均购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴别及药物敏感性判断

使用全自动微生物分析仪鉴定菌种。药物敏感性试验, 标准菌株为大肠埃希菌 ATCC25922, 根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS/CLSI)2015 年版标准判断抗菌药物敏感性。

1.2.2 溶液制备

菌悬液^[6]: 取上述经鉴定的 MDR-Ab 菌株, 接种于肉汤中增菌, 35℃ 下培养 6 h 后, 取 3 mL 菌液通过比浊仪, 校正其浊度至 0.5 Mac Farland, 然后再用 MH 肉汤稀释至 1.5×10^5 cfu/mL。

中药活性成分溶液: 分别称取丁香酚、姜黄素和大蒜素适量, 精密称定, 先加入少量二甲基亚砜(DMSO)溶解, 再加入水(DMSO 含量不超过 1%), 超声, 定容。

1.2.3 最低抑菌浓度(MIC)测定

参照文献[7]方法稍作修改, 用微量倍比稀释法测定药物的 MIC 值。丁香酚、姜黄素、大蒜素溶液(初始质量浓度为 0.8 mg/mL, 1% DMSO) 分别用 MH 肉汤培养基连续倍比稀释 9 个质量浓度, 添加至无菌 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ L, 分别接种等体积 1.5×10^5 cfu/mL 的菌悬液, 并以 1% DMSO 作为溶剂对照, 以亚胺培南作为阳性对照(亚胺培南 MIC 由前述分析仪测得), 以空白培养基为阴性对照; 于 37℃ 恒温箱中培养 24 h 后观察, 用酶标仪在 600 nm 波长下检测光密度(OD)值, 将每孔所得到的 OD 值减去空白对照孔的和溶剂对照孔 OD 值, 再除以生长对照孔与溶剂对照孔 OD 值差, 即每孔内细菌的生长百分数。以抑制 80% 细菌生长的最低药物浓度作为 MIC 判读各化合物的 MIC 值。每组质量浓度设置 2 个复孔, 重复操作 3 次, 绘制生长曲线, 分别检测 20 株 MDR-Ab, 推算 50% 最低抑菌浓度(MIC₅₀)和 90% 最低抑菌浓度(MIC₉₀)。

2 结果

2.1 3 种成分对 MDR-Ab 的抑制情况

丁香酚对 MDR-Ab 抑菌作用最显著, 大蒜素的抑制作用弱于丁香酚, 姜黄素抑制作用最弱。详见表 1。

2.2 丁香酚对 MDR-Ab 生长曲线的影响

选取菌株 1、菌株 2、菌株 3, 分别给予质量浓度为 32, 64, 128 μ g/mL 的丁香酚干预, 每株设置空白对照, 以培养时间为横坐标, 600 nm 波长处测定的药物孔 OD 值减去空白孔 OD 值的均值为纵坐标, 绘制 MDR-Ab 生长曲线。与空白对照相比, 在丁香酚作用下, MDR-Ab 进入对数生长期的时间点和进入对数生长期延续时间无明显改变, 但生长受到明显抑制, 无法达到生长高峰。详见图 1。

表 1 中药活性成分对 MDR-Ab 的抑菌活性(μ g/mL)

活性成分	MIC 范围	MIC ₅₀ (n = 20)	MIC ₉₀ (n = 20)
丁香酚	32 ~ 256	128	256
姜黄素	1 024	1 024	-
大蒜素	64 ~ 1 024	512	1 024

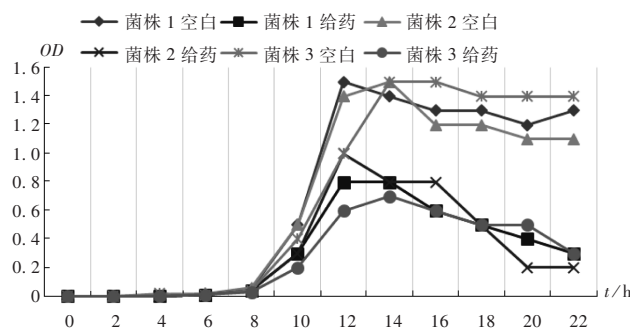


图 1 丁香酚对 MDR-Ab 生长曲线的影响

3 讨论

鉴于鲍曼不动杆菌的多重耐药性, 可选药物少之又少, 如何治疗该菌感染成为全球性难题。该菌耐药机制主要包括: 灭活酶或修饰酶(水解 β -内酰胺酶及氨基糖苷类修饰酶)的产生; 细胞膜通透性降低, 使得孔蛋白修饰减少, 抗生素难以进入菌体; 药物作用靶位改变, 药物到达作用靶位量减少; 形成生物被膜阻止抗生素接触菌体, 适应了抗生素选择压力, 进而抵抗抗生素杀菌作用; 外排泵高度表达使得多种药物被排出菌体; 耐药决定簇水平传播遗传元件或基因结构的突变使得细胞功能失活及改变修饰^[8]。治疗该菌感染的一种方法是利用不同抗生素之间的协同或相加作用提高治疗药效, 减少耐药菌株, 但对于偶然出现的全耐药病菌仍然束手无策; 另一种方法则是研制新的抗菌药物, 在目前抗生素研发不景气的情况下, 许多研究者把目光转向从植物中寻找具有抗耐药菌活性的化合物。研究发现, 许多中药可干扰细菌的酶系、诱导蛋白质凝固及改变细胞膜的通透性, 甚至干扰细菌生长及繁殖^[9], 阻断细菌某个组分的合成或抑制细菌外排泵, 从而达到抑菌作用^[10]。

姜黄素为二酮类色素, 是中药姜黄的主要成分, 姜黄素具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等生物活性, 对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及幽门螺杆菌均有抑制作用^[11]。大蒜既是常用调味品, 同时也具有抗病原微生物活性, 其主要有效成分为大蒜素, 可显著抑制表皮葡萄球菌生长^[12]。丁香酚是中药丁香挥发油的主要成分, 具有广谱抗菌活性; 近期研究表明, 丁香酚可迅速与奇异变形杆菌细胞膜相互作用, 改变其渗透性并释放细胞内成分, 从而导致细胞死亡^[13]。也有研究表明, 丁香酚可以抑制鲍曼不动杆菌附着和入侵人体皮肤, 从而抑制其生物膜形成^[14]。本研究结果显示, 丁香酚、姜黄素和大蒜素均对 MDR-Ab 有一定抑制作用, 为进一步开发新型植物源抑菌药物提