

没食子酸与5种抗生素联用对铜绿假单胞菌的体外抑菌活性

王春娟^{1,2*}, 左国营^{1#}, 王根春¹(1.成都军区昆明总医院药学部, 昆明 650032; 2.昆明医科大学, 昆明 650500)

中图分类号 R378.99; R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)01-0025-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.09

摘要 目的:研究没食子酸与5种常用抗生素联用对铜绿假单胞菌的体外抑菌活性。方法:收集铜绿假单胞菌标准菌株和10株临床分离菌株,采用琼脂平板稀释法分别测定没食子酸和5种常用抗生素(头孢他啶、氨基糖苷、左氧氟沙星、磷霉素和头孢曲松)对铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度(MIC);以MIC为始浓度,采用棋盘式微量稀释法测定没食子酸分别与5种抗生素单用及联用对铜绿假单胞菌的抑菌作用,以部分抑菌浓度指数(FICI)评价其联用效果;并以临床分离菌株IRPA 314为目标菌株,采用时间-抑菌曲线进行验证。结果:5种抗生素均能降低没食子酸对11株铜绿假单胞菌的MIC, FICI均在0.188~1.000内,呈现较好的协同或相加作用。在时间-抑菌曲线中,没食子酸与5种抗生素联用24 h时比单用时抑菌浓度的lg值均降低了2.085~3.416,均表现为协同作用。结论:没食子酸分别与头孢他啶、氨基糖苷、左氧氟沙星、磷霉素、头孢曲松联用对铜绿假单胞菌的体外抑菌作用表现为协同或相加作用。
关键词 没食子酸;铜绿假单胞菌;抗生素;协同作用

Antimicrobial Activity of Gallic Acid Combined with 5 Kinds of Antibiotics Against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro

WANG Chun-juan^{1, 2}, ZUO Guo-ying¹, WANG Gen-chun¹(1.Dept. of Pharmacy, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, China; 2.Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study antimicrobial activity of gallic acid combined with 5 kinds of commonly used antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) in vitro. METHODS: *P. aeruginosa* standard strains and 10 strains of clinical isolates were collected. Agar dilution method was used to determine MIC of gallic acid combined with 5 kinds of commonly used antibiotics as ceftazidime, aztreonam, levofloxacin, fosfomycin and ceftriaxone against *P. aeruginosa*. Using MIC as initial concentration, the trace checkerboard dilution method was used to determine antimicrobial effect of gallic acid alone or combined with 5 kinds of antibiotics against *P. aeruginosa*. Fractional inhibitory concentration index (FICI) was used to evaluate the effects of drug combination. Time-antibacterial curves were used to validate the trial results with clinical isolates IRPA 314 as target strain. RESULTS: 5 kinds of antibiotics could decrease the MIC of gallic acid against 11 kinds of *P. aeruginosa*, and FICI of them were between 0.188 and 1.000, presenting good synergy effect. In time-antibacterial curve, compared with alone, the inhibitory concentration (lg) of gallic acid combined with 5 kinds of antibiotics for 24 h reduced by 2.085-3.416, also showing the synergy effect. CONCLUSIONS: Gallic acid combined with ceftazidime, aztreonam, levofloxacin, fosfomycin and ceftriaxone show synergy and additive antimicrobial effect against *P. aeruginosa*.

KEYWORDS Gallic acid; *Pseudomonas aeruginosa*; Antibiotics; Synergy effect

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是近年医院内获得性的主要致病菌之一,其广泛分布于自然界,外膜脂多糖层与磷脂层之间由鲍林蛋白形成的孔道比一般革兰阴性杆菌的孔道小,多种抗革兰阴性杆菌的抗生素难以通过,使铜绿假单胞菌具有对多种抗生素天然耐药的特性^[1-2],给临床治疗带来了极大的困难。目前单用治疗此类感染的抗生素已远远不能满足治疗需求,因此笔者将目光转移到了联合用药上。没食子酸具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等药理作用,在抗菌方面主要对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌和奈瑟氏球菌等具有一定的体外抑菌活性,对铜绿假单胞菌的作用最为突出。但以前的研究大多是没食子酸单用抗铜绿假单胞菌,而将没食子酸和抗生素联合抑菌的研究甚少。基于此,本试验通过将没食子酸和临床常用的5种抗生素联合作用于铜绿假单胞菌,

从而找出联用时具有协同或相加效果的抗生素,扩展其联合用药的范围,由此一方面可以减少抗生素的临床用量,降低抗生素大量使用引起的毒性反应;另一方面,也可降低或逆转致病菌对抗生素的耐药现状,从而期望达到更好的临床治疗效果。

1 材料

1.1 仪器

电热手提压力蒸汽消毒器(上海医用核子仪器厂); FA1004型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); XW-80A旋涡混合器(上海精科实业有限公司); CHA-213电子显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

没食子酸原料药(解放军昆明总医院药学部提供,批号:110831,纯度:98%);注射用头孢他啶(昆明积大制药有限公司,批号:060202,规格:每只1g);注射用氨基糖苷(山东罗欣药业股份有限公司,批号:20084213,规格:每只1g);盐酸左氧氟沙星注射液(扬子江药业集团有限公司,批号:10020301,规

* 硕士。研究方向:天然产物抗菌活性成分。E-mail: ziyezhiye2008@163.com

通信作者:主任药师,硕士研究生导师。研究方向:天然产物抗菌活性成分。电话:0871-64774941。E-mail: zuoguoying@263.net

格:0.1 g:2 ml);注射用磷霉素(华北制药股份有限公司,批号:1001107,规格:每只0.5 g);注射用头孢曲松(哈药集团制药总厂,批号:121721,规格:每只1 g)。

1.3 菌株

铜绿假单胞菌标准菌株(编号:ATCC27853)由中国食品药品检定研究院提供;临床分离的耐药菌株:耐亚胺培南铜绿假单胞菌(Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, IRPA)均来自成都军区昆明总医院肺部感染患者的痰液标本,经美国临床实验室标准委员会2007版^[9]判定,编号:IRPA 0、IRPA 18、IRPA 120、IRPA 166、IRPA 172、IRPA 276、IRPA 291、IRPA 307、IRPA 314、IRPA R。

1.4 培养基

M-H琼脂培养基(批号:090425)、M-H肉汤培养基(批号:090204)(杭州天和微生物试剂有限公司);二甲亚砜[DMSO,利安隆博华(天津)医药化学有限公司,批号:20091126]。

2 方法

2.1 菌液的配制

将菌株接种于普通琼脂平板上,置于35℃恒温箱培养24 h,用无菌0.9%氯化钠注射液(生理盐水)配成 1.5×10^8 、 1×10^6 CFU/ml的菌液备用。

2.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定

采用倍比稀释法^[3],35℃恒温箱中培养18~24 h,测定没食子酸和5种常用抗生素头孢他啶、氨基曲南、左氧氟沙星、磷霉素、头孢曲松单用及联用时对铜绿假单胞菌标准菌株和10株临床分离菌株的MIC,重复3次,取平均值。

2.3 部分抑菌浓度指数(FICI)的测定

以MIC为始浓度,采用棋盘式微量稀释法^[9-11],35℃恒温箱中培养18~24 h,测定没食子酸分别与5种抗生素单用及联用时对铜绿假单胞菌标准菌株和10株临床分离菌株的抑菌活性,计算 $FICI = (\text{联用时甲药MIC} / \text{单用时甲药MIC}) + (\text{联用时乙药MIC} / \text{单用时乙药MIC})$ ^[6-8]。FICI≤0.5为协同作用,0.5<F≤1.0为相加作用,以此评价联用效果,重复3次,取平均值。

2.4 验证方法

采用时间-抑菌曲线试验^[7-8],以IRPA 314为目标菌株,作用0、4、8、12、24 h,以lgx(x指抑菌浓度)为纵坐标、时间为横坐标,绘制没食子酸与5种抗生素联用的抑菌曲线,进一步验证抑菌活性,重复3次,取平均值。

3 结果

3.1 MIC与FICI结果

没食子酸与头孢他啶、氨基曲南、左氧氟沙星、磷霉素、头孢曲松联用对铜绿假单胞菌的抑菌作用见表1~表5。

表1结果显示,没食子酸与头孢他啶联用对11株铜绿假单胞菌中的6株表现为协同作用,有5株表现为相加作用。表2结果显示,没食子酸与氨基曲南联用对11株铜绿假单胞菌中的6株表现为协同作用,有5株表现为相加作用。表3结果显示,没食子酸与左氧氟沙星联用对11株铜绿假单胞菌中的8株表现为协同作用,有3株表现为相加作用。表4结果显示,没食子酸与磷霉素联用对11株铜绿假单胞菌中的4株表现为协同作用,有7株表现为相加作用。表5结果显示,没食子酸与头

孢曲松联用对11株铜绿假单胞菌中的6株表现为协同作用,有5株表现为相加作用。

表1 没食子酸与头孢他啶联用对铜绿假单胞菌的抑菌作用
Tab 1 Antimicrobial effect of gallic acid combined with ceftazidime against *P. aeruginosa*

菌种	单用MIC, μg/ml		联用MIC, μg/ml		FICI	作用方式
	没食子酸	头孢他啶	没食子酸	头孢他啶		
IRPA 0	128	2	64	0.5	0.750	相加
IRPA 18	256	4	64	1	0.500	协同
IRPA 120	256	4	64	1	0.500	协同
IRPA 166	128	4	64	1	0.750	相加
IRPA 172	128	4	32	1	0.500	协同
IRPA 276	128	4	32	2	0.750	相加
IRPA 291	128	4	32	2	0.750	相加
IRPA 307	128	2	32	0.5	0.500	协同
IRPA 314	128	2	32	1	0.750	相加
IRPA R	128	4	32	1	0.500	协同
ATCC27853	128	4	32	1	0.500	协同

表2 没食子酸与氨基曲南联用对铜绿假单胞菌的抑菌作用
Tab 2 Antimicrobial effect of gallic acid combined with aztreonam against *P. aeruginosa*

菌种	单用MIC, μg/ml		联用MIC, μg/ml		FICI	作用方式
	没食子酸	氨基曲南	没食子酸	氨基曲南		
IRPA 0	64	128	16	32	0.500	协同
IRPA 18	128	128	32	32	0.500	协同
IRPA 120	128	128	16	32	0.375	协同
IRPA 166	128	128	16	32	0.375	协同
IRPA 172	128	128	16	64	0.625	相加
IRPA 276	128	128	32	16	0.375	协同
IRPA 291	128	128	64	64	1.000	相加
IRPA 307	128	128	32	64	0.750	相加
IRPA 314	128	128	32	32	0.500	协同
IRPA R	128	128	8	64	0.562	相加
ATCC27853	128	32	32	16	0.750	相加

表3 没食子酸与左氧氟沙星联用对铜绿假单胞菌的抑菌作用
Tab 3 Antimicrobial effect of gallic acid combined with levofloxacin against *P. aeruginosa*

菌种	单用MIC, μg/ml		联用MIC, μg/ml		FICI	作用方式
	没食子酸	左氧氟沙星	没食子酸	左氧氟沙星		
IRPA 0	128	4	64	2	1.000	相加
IRPA 18	128	4	32	0.5	0.375	协同
IRPA 120	128	4	32	0.5	0.375	协同
IRPA 166	128	4	32	1	0.500	协同
IRPA 172	128	4	64	1	0.750	相加
IRPA 276	128	4	32	1	0.500	协同
IRPA 291	128	4	32	0.5	0.375	协同
IRPA 307	128	4	32	0.5	0.375	协同
IRPA 314	128	4	32	1	0.500	协同
IRPA R	128	4	16	1	0.375	协同
ATCC27853	128	1	16	0.5	0.625	相加

3.2 时间-抑菌曲线

与头孢他啶、氨基曲南、左氧氟沙星、磷霉素和头孢曲松单用时比较,联用24 h时 $\Delta \lg x$ [$\Delta \lg x$ 表示联用时lgx与单用时lgx的差值]分别降低了3.399、3.416、3.244、3.017、2.085,均呈现了较好的协同作用效果。没食子酸与5种抗生素联用的时间-抑菌曲线见图1。

表4 没食子酸与磷霉素联用对铜绿假单胞菌的抑菌作用

Tab 4 Antimicrobial effect of gallic acid combined with phosphonomycin against *P. aeruginosa*

菌株	单用MIC, $\mu\text{g/ml}$		联用MIC, $\mu\text{g/ml}$		FICI	作用方式
	没食子酸	磷霉素	没食子酸	磷霉素		
IRPA 0	64	4	16	2	0.750	相加
IRPA 18	64	4	16	1	0.500	协同
IRPA 120	64	4	16	0.5	0.375	协同
IRPA 166	64	8	32	2	0.750	相加
IRPA 172	64	8	16	2	0.500	协同
IRPA 276	64	4	16	2	0.750	相加
IRPA 291	64	8	32	4	1.000	相加
IRPA 307	64	8	32	4	1.000	相加
IRPA 314	64	4	16	1	0.500	协同
IRPA R	64	8	32	2	0.750	相加
ATCC27853	64	2	32	0.5	0.750	相加

表5 没食子酸与头孢曲松联用对铜绿假单胞菌的抑菌作用

Tab 5 Antimicrobial effect of gallic acid combined with ceftriaxone against *P. aeruginosa*

菌株	单用MIC, $\mu\text{g/ml}$		联用MIC, $\mu\text{g/ml}$		FICI	作用方式
	没食子酸	头孢曲松	没食子酸	头孢曲松		
IRPA 0	128	128	32	32	0.500	协同
IRPA 18	64	128	16	32	0.500	协同
IRPA 120	128	128	32	16	0.375	协同
IRPA 166	128	128	64	64	1.000	相加
IRPA 172	128	128	16	8	0.188	协同
IRPA 276	64	128	32	32	0.750	相加
IRPA 291	128	128	32	64	0.750	相加
IRPA 307	128	128	32	32	0.500	协同
IRPA 314	128	128	64	32	0.750	相加
IRPA R	128	128	32	64	0.750	相加
ATCC27853	128	8	4	2	0.281	协同

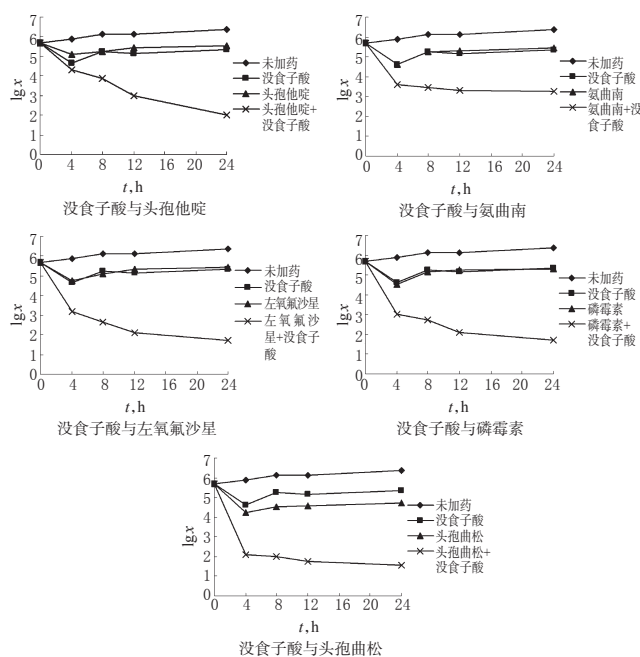


图1 没食子酸与5种抗生素联用对IRPA 314的时间-抑菌曲线
Fig 1 Time-antibacterial curves of gallic acid combined with 5 kinds of antibiotics against IRPA 314

4 讨论

笔者前期采用K-B纸片扩散法将没食子酸与不同抗生素进行配对筛选,选择各类型抗生素中的5种代表药进行试验,结果确定5种代表药分别为头孢他啶、氨基糖苷、左氧氟沙星、磷霉素和头孢曲松。

在棋盘式微量稀释法中,FICI值越小,联合用药后的协同作用效果越好,当没食子酸与抗生素联合使用时, $1.000 \geq \text{FICI} \geq 0.188$,对抗生素具有增效的作用^[3-4]。在时间-抑菌曲线中, $\Delta \lg x$ 值越大,则说明联用时的效果越好,对抗生素的辅助作用也越好。通过时间-抑菌曲线的结果可知没食子酸与5种抗生素联用时 $\Delta \lg x$ 均 >2 ,均为协同作用效果。

总的来说,当没食子酸和抗生素联用时,对抗生素呈现了一定的增效作用,这有可能降低或逆转铜绿假单胞菌对抗生素的耐药性,增强抗生素使用效果,为以后铜绿假单胞菌引致的疾病的治疗提供参考。

参考文献

- [1] 柯堃.亚胺培南治疗PA杆菌肺炎临床观察[J].中国社区医师,2012,14(14):39.
- [2] 秦金喜,李仲兴,袁欣,等.铜绿假单胞菌对光滑念珠菌的体外抑菌活性研究[J].临床荟萃,2012,27(7):574.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement*[S/OL]. (2012-01) [2013-03-25]. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>.
- [4] Dastidar SG, Manna A, Kumar KA, et al. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 23(1):99.
- [5] Sato M, Tanaka H, Oh-Uchi T, et al. Antibacterial activity of phytochemicals isolated from *Erythrina zeyheri* against vancomycin-resistant enterococci and their combinations with vancomycin[J]. *Phytother Res*, 2004, 18(11):906.
- [6] Nkengfack AE, Vardamides JC, Fomum ZT, et al. Prenylated isoflavanone from *erythrina eriotricha*[J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(6):1 803.
- [7] An J, Zuo GY, Hao XY, et al. Antibacterial and synergy of a flavanone rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA)[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(11):990.
- [8] Lin E, Stanek RJ, Mufson MA. Lack of synergy of erythromycin combined with penicillin or cefotaxime against *Streptococcus pneumoniae* in vitro[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(3):1 151.

(收稿日期:2013-03-27 修回日期:2013-05-04)