

## 地锦草与 5 种抗菌药联用对猪链球菌的体外抑菌效果

江超<sup>1</sup>, 姚飞虹<sup>2</sup>, 张之怡<sup>1</sup>, 程庆<sup>1</sup>, 罗稀楷<sup>1</sup>, 李嗣忻<sup>1</sup>, 舒宇<sup>1</sup>, 王歧本<sup>1\*</sup>

(1. 湘南学院基础医学院, 湖南郴州 423000; 2. 湘南学院药学院, 湖南郴州 423000)

**摘要** [目的]探究地锦草与其他抗菌药物对猪链球菌的体外联合抗菌效果,达到有效防止猪链球菌的目的。[方法]采用琼脂稀释法、微量肉汤棋盘稀释法,分别测定了地锦草与庆大霉素、青霉素、头孢曲松、阿莫西林、硫酸链霉素对 3 株猪链球菌的最小抑菌浓度(MIC)及分级抑菌浓度指数(FIC)。[结果]地锦草和 5 种抗菌药联用后对 3 株链球菌的 MIC 有不同程度的降低,联用后都表现为相加或协同效果。[结论]地锦草在体外与 5 种抗菌药联用可减少抗菌药物用量,增强药物对细菌的抑制作用。

**关键词** 地锦草; 抗菌药物; 体外联合药敏试验; 猪链球菌

中图分类号 S853.7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)24-0114-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.24.034

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Antibacterial Effect of *Euphorbia humifusa* Combining with Five Antimicrobials against *Streptococcus suis* in vitro

JIANG-Chao<sup>1</sup>, YAO Fei-hong<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-yi<sup>1</sup> et al (1. The Basic Medical College of Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000; 2. Pharmacy College of Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000)

**Abstract** [Objective] In order to effectively prevent *Streptococcus suis*, *Euphorbia humifusa* combining with five antimicrobials against *S. suis* in vitro was studied. [Method] The classical agar dilution method and micro broth checkerboard dilution method were used, the sensitivity effects of *Euphorbia humifusa* combining with gentamicin, streptomycin sulfate, penicillin, ceftriaxone, amoxicillin againsts three serotypes *S. suis* were tested in vitro, the minimum inhibitor concentration(MIC) and the fractional inhibitory concentration(FIC) were calculated. [Result] After combining, the MIC of the *Euphorbia humifusa* and the five kinds of antibacterials to the three strains of *S. suis* had different degrees of reduction, the combined effect was additive or synergistic. [Conclusion] It is suggested that the combination of five kinds of antibacterial with *Euphorbia humifusa* in vitro can reduce the antibacterial drugs and enhance the inhibitory effect of drugs on bacteria.

**Key words** *Euphorbia humifusa*; Antimicrobials; Combined susceptibility test in vitro; *Streptococcus suis*

抗生素是常用的一种药物,但是随着抗生素的滥用与乱用,耐药菌株也越来越多地出现,同时抗生素的残留和副作用使得抗生素的使用令人堪忧。近年来,随着人们对健康环保意识的增强,中药研究成为国内外学者研究的热点,中药中的许多成分如有机酸、生物碱、黄酮类、苯醌等成分都有一定的抗菌作用,且中药具有低残留、不易诱导细菌产生耐药性等优点<sup>[1-4]</sup>,但是由于中药的抑菌活性比较小、应用成本高、疗效比较慢的缺点使得其在临床应用中受到了一定的制约。中药与抗菌药物联用防治细菌性疾病成为现在研究的热点<sup>[5-8]</sup>。猪链球菌病是一种人畜共患的细菌性疾病,该病给全球养猪业造成了非常大的经济损失,也危害公众健康安全,猪链球菌感染人导致人患脑膜炎、眼内炎等,其中出现脑膜炎的概率最高,我国曾出现过几次感染人的事件<sup>[9]</sup>。地锦草是一种常见的中草药,具有清热解毒、抗菌止泻等作用,关于地锦草应用和抑菌作用的报道比较多,但是关于地锦草与抗菌药物联用对猪链球菌的抑菌作用效果鲜见报道<sup>[10-13]</sup>。该研究旨在观察地锦草与抗菌药物联用对临床分离的猪链球菌的体外抑菌效果,以期为临床合理用药提供指导,达到有效防治猪链球菌病的目的。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 菌株。猪链球菌 3 株,编号分别为 SS<sub>2</sub>、SS<sub>7</sub>、SS<sub>m</sub>,分离

自郴州地区某大型猪场。质控菌株肺炎链球菌(编号 ATCC49619),购自中国药品生物制品检定所。

1.1.2 药物与试剂。抗生素:青霉素、头孢曲松、庆大霉素、阿莫西林、硫酸链霉素均为国产药,市购,按《中华人民共和国药典》要求鉴定合格,使用时均在有效期内。

中药:地锦草,自采,按《中华人民共和国药典》要求鉴定合格。

培养基:脑心浸出液肉汤培养基(brain heart infusion broth, BHI)(批号:20181126)、琼脂粉(批号:20190322)、小牛血清(购自杭州四季青生物工程材料有限公司)。

1.1.3 主要仪器设备。SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化设备公司);恒温恒湿培养箱;电热鼓风干燥箱;立式电热压力蒸汽灭菌器(上海博迅公司医疗设备厂);AUW120D 型电子天平(日本岛津);微量可调移液器(德国 Eppendorf 公司);SHA-B 型水浴恒温摇床等。

## 1.2 方法

1.2.1 抗菌药物母液的配制。用十万分之一电子天平准确称取适量青霉素、庆大霉素、阿莫西林、硫酸链霉素、头孢曲松,分别配制成浓度为 2 560 μg/mL 的母液 50 mL,过滤除菌,-20 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 地锦草水提液的制备。称取地锦草干燥粉末 20 g,加入 200 mL 蒸馏水,浸泡 30 min 后煮沸,煎煮计时 30 min,在煎煮过程中要注意搅拌,煎煮 3 次,每次煎得的药液和药渣都用纱布趁热过滤,合并 3 次滤液后,浓缩至生药浓度为 1 g/mL,即为地锦草水提液。过滤除菌,4 °C 冰箱保存,备用。

1.2.3 菌悬液的制备。将菌种从-80 °C 冰箱中取出,在超净工作台用接种环划线接种于含 5% 小牛血清脑心浸出液的

**基金项目** 湖南省教育厅科研项目(2015C1286, 2016C1492);湘南学院 2018 学年校级实验室开放项目(27);湖南省普通高等学校重点实验室湘南学院心脑血管天然药物研究实验室项目(XN2017K05)。

**作者简介** 江超(1982—),女,湖南株洲人,硕士,从事药理与毒理研究。\*通信作者,教授,硕士,从事微生物学研究。

**收稿日期** 2019-08-19;修回日期 2019-08-30

琼脂培养基上,37 ℃ 培养 18~24 h;观察菌落的形态特点,挑取单个菌落接种到脑心浸出液肉汤培养基中增菌培养,37 ℃ 振荡培养 18~24 h;调整菌液浓度至 0.5 麦氏比浊度,使用时用生理盐水进行稀释。

**1.2.4 单独用药时最小抑菌浓度(MIC-single,简写 MIC-s)的测定(琼脂稀释法)<sup>[14]</sup>。**分别测定地锦草提取液、青霉素、硫酸链霉素、头孢曲松、庆大霉素、阿莫西林对 3 株猪链球菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

分别取 2 mL 对倍稀释的上述抗生素溶液加入 18 mL 灭菌的含 5% 新生小牛血清的 BHI 琼脂培养基(注意培养基温度冷却至 50 ℃),混匀后倒入平板,冷却,各药物设置 15 个浓度(最终浓度为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25、0.015 6 μg/mL)。每个浓度 3 个重复,将麦氏比浊度为 0.5 的菌液用生理盐水稀释 100 倍后,用微量移液器吸取 1~2 μL 菌液接种于已制备好的含药平板表面,待菌液吸收后置于 37 ℃ 恒温恒湿培养箱培养 18~24 h,观察结果,以无菌生长(单个菌落忽略不计)的最低浓度为该药单独用药时的 MIC-single。

**1.2.5 联合药敏试验(微量肉汤棋盘法)<sup>[15]</sup>。**取 96 孔无菌微孔板,在方阵的横列中,将地锦草用灭菌 BHI 肉汤进行倍比稀释;在方阵的纵列中,将青霉素用灭菌 BHI 肉汤进行倍

比稀释,使地锦草和青霉素初始孔的终浓度分别为单独用药时 MIC 的 2 倍,共稀释 6 个浓度,2 种药物的量各为 50 μL,最后无菌微孔板中加入 100 μL 菌液,使最终菌液浓度为  $5 \times 10^5$  CFU/mL,37 ℃ 振荡培养 18~24 h(设 3 个重复),观察结果。选择最佳组合效应时,2 药联合时的各自的 MIC(MIC-combined,简写 MIC-c)。通过计算抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration, FIC)判断相互作用。

地锦草与硫酸链霉素、阿莫西林、头孢曲松、庆大霉素的联合药敏方法同青霉素,结果见表 2~4。

$FIC = A \text{ 药 MIC-combined} / A \text{ 药 MIC-single} + B \text{ 药 MIC-combined} / B \text{ 药 MIC-single}$ , FIC 指数  $\leq 0.5$  表示两药具有协同作用; $>0.5 \sim 1.0$  表示相加作用; $>1.0 \sim 2.0$  表示无关; $>2.0$  表示拮抗作用<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 各药物单独用药时的最小抑菌浓度(MIC-s)** 由表 1 可知,地锦草水提液对 3 株猪链球菌都有一定的抑菌作用, MIC 为生药浓度  $1.25 \times 10^5$  μg/mL,按照郎利敏等<sup>[16]</sup>介绍的判断标准,处于中度敏感程度(MIC < 7.80 mg/mL 为高度敏感, 7.80 mg/mL  $\leq$  MIC < 250 mg/mL 为中度敏感)。5 种抗菌药物的 MIC 结果显示,3 株猪链球菌对 5 种抗菌药物都不同程度地产生了一些耐药,有些菌株还产生了多重耐药。

表 1 6 种药物对 3 株猪链球菌的 MIC-s

Table 1 The MIC-s of six kinds of antimicrobials against three *Streptococcus suis*

菌株(MIC-s) Strain	地锦草 <i>Euphorbia humifusa</i>	青霉素 Penicillin	硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	庆大霉素 Gentamicin	阿莫西林 Amoxicillin	头孢曲松 Ceftriaxone
SS <sub>2</sub>	$1.25 \times 10^5$	0.062 5	>256	16	0.062 5	0.25
SS <sub>7</sub>	$1.25 \times 10^5$	0.031 25	16	1	0.031 25	0.125
SS <sub>m</sub>	$1.25 \times 10^5$	2	32	0.062 5	16	0.25

注:MIC-s 为单独用药时的 MIC 值

Note:MIC-s means the MIC of single medication

**2.2 地锦草与 5 种抗菌药物对猪链球菌的体外联合抑菌试验结果** 由表 2~4 可知,联合药敏试验的 FIC 在 0.5~1.0,属于相加或协同作用,其中地锦草与头孢曲松的联合效果为协同,其余为相加。联合用药后药物的 MIC 值较单独用药时的

MIC 值都有不同程度的降低,地锦草联合用药后的 MIC 为单独用药的 1/4~1/2,5 种抗菌药物联合用药后的 MIC 为单独用药时 MIC 的 1/8~1/2。

表 2 地锦草与 5 种抗菌药物对猪链球菌 SS<sub>2</sub> 的体外联合试验结果

Table 2 Sensitivity effects of *Euphorbia humifusa* combined with five kinds of antimicrobials against SS<sub>2</sub>

药物 Drug	抗生素 Antibiotic		地锦草 <i>Euphorbia humifusa</i>		FIC	结果 Result
	MIC-s μg/mL	MIC-c μg/mL	MIC-s $\times 10^5$ μg/mL	MIC-c $\times 10^5$ μg/mL		
青霉素 Penicillin	0.031 25	0.015 6	1.25	0.625	0.75	相加
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	>256	—	1.25	—	—	—
庆大霉素 Gentamicin	16	4	1.25	0.625	0.75	相加
阿莫西林 Amoxicillin	0.062 5	0.015 6	1.25	0.625	0.75	相加
头孢曲松 Ceftriaxone	0.25	0.062 5	1.25	0.312 5	0.5	协同

注:MIC-s 为单独用药时的 MIC 值, MIC-c 为联合用药时的 MIC 值

Note:MIC-s means the MIC of single medication, MIC-c means the MIC of combined-use of drugs

## 3 结论与讨论

(1) 地锦草是一种常见的中草药,有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等药理作用,关于地锦草的抗菌作用研究报道很多,贾艳华等<sup>[8]</sup>测定地锦草水提液对鸡致病性大肠杆菌的最小抑菌浓度为 7.813~31.250 mg/mL;严晗光等<sup>[17]</sup>测定地锦

草水提液对猪源性致病性大肠杆菌的最低抑菌浓度为 62.5 mg/mL,这与该试验结果基本一致,中药的药物剂量要远远大于西药的药物剂量。该试验选取的 5 种抗菌药物是临床常用的抗菌药,试验结果提示目前猪链球菌的耐药形势比较严重,因此一旦确诊为该菌感染,应通过药敏试验进行

选药,不能盲目用药。

表3 地锦草与5种抗菌药物对猪链球菌SS<sub>7</sub>的体外联合试验结果

Table 3 Sensitivity effects of *Euphorbia humifusa* combined with five kinds of antimicrobials against SS<sub>7</sub>

药物 Drug	抗生素 Antibiotic		地锦草 <i>Euphorbia humifusa</i>		FIC	结果 Result
	MIC-s μg/mL	MIC-c μg/mL	MIC-s ×10 <sup>5</sup> μg/mL	MIC-c ×10 <sup>5</sup> μg/mL		
青霉素 Penicillin	0.031 25	0.007 8	1.25	0.625	0.75	相加
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	16	8	1.25	0.625	1	相加
庆大霉素 Gentamicin	1	0.25	1.25	0.625	0.75	相加
阿莫西林 Amoxicillin	0.031 25	0.015 6	1.25	0.625	0.75	相加
头孢曲松 Ceftriaxone	0.125	0.031 25	1.25	0.312 5	0.5	协同

注:MIC-s为单独用药时的MIC值,MIC-c为联合用药时的MIC值

Note:MIC-s means the MIC of single medication,MIC-c means the MIC of combined-use of drugs

表4 地锦草与5种抗菌药物对猪链球菌SS<sub>m</sub>的体外联合试验结果

Table 4 Sensitivity effects of *Euphorbia humifusa* combined with five kinds of antimicrobials against SS<sub>m</sub>

药物 Drug	抗生素 Antibiotic		地锦草 <i>Euphorbia humifusa</i>		FIC	结果 Result
	MIC-s μg/mL	MIC-c μg/mL	MIC-s ×10 <sup>5</sup> μg/mL	MIC-c ×10 <sup>5</sup> μg/mL		
青霉素 Penicillin	2	0.25	1.25	0.625	0.625	相加
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	32	16	1.25	0.625	1	相加
庆大霉素 Gentamicin	0.062 5	0.031 25	1.25	0.625	1	相加
阿莫西林 Amoxicillin	16	4	1.25	0.625	0.75	相加
头孢曲松 Ceftriaxone	0.25	0.062 5	1.25	0.312 5	0.5	协同

注:MIC-s为单独用药时的MIC值,MIC-c为联合用药时的MIC值

Note:MIC-s means the MIC of single medication,MIC-c means the MIC of combined-use of drugs

(2) 中药和抗菌药物联用后具有取长补短的作用,大量试验证明中药和抗菌药物联用后,抗菌药物的使用量都得到大幅度的降低,从而减少了药物对机体的毒副作用,同时又克服了中药单独用药的缺陷。潘任桃等<sup>[7]</sup>将茶皂素与4种抗菌药物联用,测定其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果,联合用药时4种抗菌药物的MIC为单独用药时的1/32~1/4。关于中药增强抗菌药物疗效的机制有文献报道说可能是中药成分中的一些具有表面活性的物质加大了抗菌药物与细菌接触的面积,提高了抗菌药物的有效浓度或是中药对细菌造成的氧化性损伤增强了病原菌对抗菌药物的敏感性<sup>[7]</sup>。也有资料报道说中药和西药联用后,中药可影响后者的体内过程,如茵陈浸膏可促进灰黄霉素的吸收,枳实可提高胆道庆大霉素的浓度<sup>[18]</sup>等,中西结合抗菌机理还有待进一步的研究。但是并不是中药和抗菌药物联用后都能起到协同或相加的作用,贾艳华等<sup>[8]</sup>通过试验发现地锦草与恩诺沙星、黏菌素等药物联用后会产生拮抗作用,在临床使用联合药物时不能盲目乱用。

(3) 该试验选用的3株菌均为临床分离的菌株,其中的2型猪链球菌为人畜共患的致病菌,地锦草与抗菌药物联用后显示出很好的效果,它可以提高疗效,降低抗菌药物的用量,减少毒副作用,扩大应用范围,并能发挥单独使用中药或抗菌药所不能取得的治疗作用。但是该试验只是在体外试验,在体内是否有抗菌作用还是一个未知数,要使其真正应用于临床,必须结合体外体内的综合效益评价,建立更准确的检测系统,确保药物安全和有效。

## 参考文献

- [1] 刘云宁,李小凤,班旭霞,等.中药抗菌成分及其抗菌机制的研究进展[J].环球中医药,2015,8(8):1012-1017.
- [2] 李建志,王晓源,王亚贤.8种中草药抗菌作用实验研究[J].中医药信息,2015,32(1):32-34.
- [3] 尹长江,路国兵,赵长祺,等.常见抗菌剂中草药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用[J].时珍国医国药,2013,24(6):1380-1381.
- [4] 薛蕾,黄丽荣,夏雷,等.大蒜素联合不同组合的水提液抗菌活性的研究[J].华西药学杂志,2014,29(5):533-535.
- [5] 周梦兰,王瑶,程敬伟,等.5种抗菌药物与舒巴坦对临床分离鲍曼不动杆菌体外联合药敏试验[J].临床检验杂志,2018,36(1):22-24.
- [6] 李贵玲,刘根焰,陈寅,等.大蒜素联合不同组合的体外抗菌作用[J].中国临床药理学杂志,2011,27(10):752-754.
- [7] 潘任桃,卢素云,刘兆颖,等.茶皂素与四种抗菌药物的体外联合抗菌效果研究[J].动物医学进展,2013,34(8):119-122.
- [8] 贾艳华,李荣誉,张国祖,等.地锦草与10种抗菌药联用对鸡大肠杆菌的体外抑菌效果[J].黑龙江畜牧兽医,2014(7):126-129.
- [9] 吕强,吴建林,袁珩,等.四川省人感染猪链球菌病流行病学调查分析[J].预防医学情报杂志,2005,21(4):379-383.
- [10] 哈斯额尔敦,吴张玉.蒙药材地锦草的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(68):38-40.
- [11] 周志瑜,谢斌,王晓敏.地锦草水提液对糖尿病小鼠的降血糖作用[J].南昌大学学报(医学版),2014,54(6):5-7,11.
- [12] KIM C G, LIM Y, LEE Y H, et al. Effect of *Euphorbia humifusa* Willd extract on the amelioration of innate immune responses[J]. Genes genomics, 2016, 38(10):999-1004.
- [13] 夏俊梅,胡中译,海洋,等.地锦草-马齿苋药对的体外抑菌作用研究[J].中国药师,2016,19(10):1843-1846.
- [14] 周宁,张建新,樊明涛,等.细菌药物敏感性实验方法研究进展[J].食品工业科技,2012,33(9):459-464.
- [15] 尹光美,苏刘艳,李俊,等.棋盘法和倍比微量稀释法在体外联合抗真菌活性药物筛选中的应用研究[J].云南民族大学学报(自然科学版),2019,28(3):246-250.
- [16] 郎利敏,王克领,张立宪,等.10味中药对畜禽大肠杆菌的体外抗菌活性试验[J].中兽医学杂志,2011(3):6-8.
- [17] 严晗光,张超颖,王宏艳,等.地锦草不同组方对大肠杆菌的体外抑菌试验[J].中国动物保健,2012,14(10):35-37.
- [18] 王志强,陈杖榴.兽用中草药与抗菌西药联合应用研究进展[J].中兽医医药杂志,2000(3):15-18.