

# 三黄汤与环丙沙星对大肠杆菌体外抑菌作用的比较

罗娜, 闫俊丽, 肖雄, 胡思纯, 何亚男, 蒋小平\* (长沙医学院病原生物学与免疫学教研室, 湖南长沙 410219)

**摘要** [目的]比较三黄汤与环丙沙星对耐药性大肠杆菌体外抑菌作用的差异,探讨二者联合使用的临床意义。[方法]试管稀释法测定三黄汤和环丙沙星的 MIC,采用分批培养法绘制在亚 MIC 浓度下二者抑菌曲线和组合用药时抑菌曲线。[结果]三黄汤、环丙沙星的 MIC 值分别为 450 mg/ml 和 15.63 μg/ml;在亚 MIC 浓度下三黄汤对大肠杆菌的抑菌曲线一直保持平稳状态;而环丙沙星抑菌曲线在起始 3~4 h 内呈下降趋势,随后保持较平稳状态。通过转接 20 次培养后,发现三黄汤的 MIC 没有明显改变,而环丙沙星 MIC 增至 90.7 μg/ml,显著增高;组合药物培养时, FIC 指数 < 0.5, 表现为协同作用;通过不同梯度组合培养测出最佳组合浓度为三黄汤 112.5 mg/ml、环丙沙星 9.38 μg/ml,在最佳组合药物的培养下,大肠杆菌的抑菌曲线起初表现环丙沙星的抑菌作用,但随后保持稳定;组合药物中转接 20 次的大肠杆菌对环丙沙星的药敏性有所提高,其 MIC 值降至 11.4 μg/ml。

**关键词** 三黄汤;环丙沙星;大肠杆菌

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)02-00619-03

## Inhibitory Effect Comparison of Sanhuang and Ciprofloxacin against *E. coli* in vitro

LUO Na et al (Department of Pathogenic Biology and Immunology, Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410219)

**Abstract** [Objective] To comparative Sanhuang with Ciprofloxacin reinstating *E. coli* in vitro antibacterial and explore the clinical significance of combination. [Method] Use tube dilution method to determine the minimum inhibitory concentration(MIC) of Sanhuang and Ciprofloxacin and draw the bacteriostatic curves when in the conditions of Sub-MIC concentration. [Result] The MIC of Sanhuang and Ciprofloxacin are 450 mg/ml and 15.63 μg/ml. When expose to Sub- MIC of Sanhuang, bacteriostatic curves kept flat in the entire times, but decreased quickly in the first 3-4 h and then increased to the beginning in the Ciprofloxacin liquid. After 20 times serial passage in Sub-MIC Ciprofloxacin. To combination drug culture fractional inhibitory concentration(FIC) index < 0.5 for synergy, the MIC of Ciprofloxacin to *E. coli* rose from 15.63 μg/ml to 90.7 μg/ml, while it did not increase in Sanhuang. By serial dilutions, the best rate were Sanhuang 112.5 mg/ml and Ciprofloxacin 9.38 μg/ml; bacteriostatic curves growth decreased quickly in the first 3-4 h like Ciprofloxacin but soon increased to the beginning, it was found that the MIC of Ciprofloxacin in combination drug dropped to 11.4 μg/ml.

**Key words** Sanhuang; Ciprofloxacin; *E. coli*

随着抗生素的滥用,细菌的耐药性日趋严重,而大肠杆菌(*Escherichia coli*)的耐药率更是高居首位,呈逐年上升的趋势。近年来,医学和兽医临床上出现了超强耐药、多重耐药性大肠杆菌。由于细菌的耐药性具有复杂性和严重性的特点,且多为不同血清型,在临床上使用疫苗难以达到满意的效果<sup>[1]</sup>,因而部分或全部恢复对抗生素的敏感性已成为当今人们关注的焦点<sup>[2]</sup>。国外主要针对大肠杆菌的耐药机制进行研究,而国内对其研究起步较晚,大多研究中草药对大肠杆菌耐药性的抑制效果<sup>[3]</sup>。大量的流行病学调查证实,许多中药在抑菌方面有着十分重要的作用,这些清热解毒的天然植物有望成为抗菌药物的重要资源,具有广阔的开发前景和应用价值<sup>[4-5]</sup>。迄今为止,国内外尚未见有关三黄汤和环丙沙星对大肠杆菌抑菌作用的比较报道。基于此,笔者比较了三黄汤和环丙沙星对大肠杆菌的抑菌作用,旨在为三黄汤治疗大肠杆菌感染提供一定的中医药学应用理论,为临床治疗细菌感染以及中药逆转大肠杆菌与减少大肠杆菌耐药性提供参考。

## 1 材料与方

**1.1 菌株** 大肠杆菌菌株(ATCC25922),由长沙医学院病原微生物学与免疫学实验室保存。

**1.2 药物** 盐酸环丙沙星(含量 98.5%,批号 020315-8,购自江南制药厂)、三黄汤(中药黄连 200 g、黄芩 200 g、大黄 100 g)。

**作者简介** 罗娜(1993-),女,湖南新化人,本科生,专业:生物技术。  
\*通讯作者,助教,硕士,从事微生物检验研究, E-mail: jiangxp2007@163.com。

**收稿日期** 2012-11-12

**1.3 培养基** 采用 M-H (Mueller-Hinton) 培养基配制方法,参照《临床检验手册》<sup>[6]</sup> 配制 LB 液体培养基:胰化蛋白胨 10 g + 酵母提取液 5 g + NaCl 10 g,摇动直至溶解,用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,用去离子水定容至 1 L,在 15 MPa 高压下蒸汽灭菌 20 min。

**1.4 试验仪器** SW-CJ-JC 型超净工作台、Pyx-DItx 型隔板式眩熬温墙葬箱、手提式篷、力蒸汽灭菌器、全鑫动电子分析天平、DZF-6050 型真空干燥箱等。

## 1.5 方法

**1.5.1 菌液制备** 将贮藏菌种接种在含 3% 去纤维羊血的 M-H 培养基上,在 5% ~ 8% CO<sub>2</sub> 孵箱 37 °C 培养 24 h 后制成浓度约 10<sup>9</sup> CFU/ml 的菌液,再将另一部分稀释 10 000 倍,使菌悬液约 10<sup>5</sup> CFU/ml。

**1.5.2 中药煎剂制剂** 提取中药有效成分制备三黄汤,取药材于三角烧瓶中,加入蒸馏水没过约 5 cm,常温浸渍 3 h,文火煎煮 30 min,滤出药液;加蒸馏水没过药材约 3 cm,煎煮 20 min,滤出药液;再加水浸没药材 1.5 cm,煎煮 15 min,滤出药液;合并 3 次滤液,调节 pH 至 7.4 ~ 7.6;常压蒸发浓缩至原药材质量与煎液体积比为 1.0 g/mol,4 °C 下保存备用<sup>[2]</sup>。

**1.5.3 单药最低抑菌质量浓度(MIC)的测定** 采用试管稀释法,在试管中用液体 LB 将三黄汤稀释成 1 000、500、250、125、62.50、31.25、15.63、7.82、3.91、0 mg/ml;将盐酸环丙沙星 LB 二倍稀释成 250、125、62.50、31.25、15.63、7.82、3.91、1.96、0.98、0.49、0.25、0.13 μg/ml 重复 3 次,接种 10<sup>5</sup> CFU/ml 浓度的大肠杆菌,37 °C 140 r/min 摇床中振荡培养 12 h 后,从适当的稀释浓度中提取 0.1 ml 涂布平板计数,分别

得到三黄汤和环丙沙星的  $MIC^{[7]}$ 。

**1.5.4 分批培养法。**在亚  $MIC$  浓度下,分别在三黄汤(225 mg/ml)和环丙沙星(7.82  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )液体培养基中接种相同浓度( $10^9$  CFU/ml)的大肠杆菌,以无药培养基作为对照,37  $^{\circ}\text{C}$  140 r/min振荡培养 12 h,接种后每小时取 0.1 ml,稀释 10 倍涂布平板计数,绘制抑菌曲线。再分别转接到相同培养基中,重复 20 次,然后采用试管二倍稀释法测定最低抑菌浓度。

**1.5.5 联合药敏试验<sup>[8-9]</sup>。**采用肉汤稀释棋盘法测定三黄汤与环丙沙星联合对大肠杆菌 ATCC25922 的体外抑菌活性,以部分抑菌浓度指数(Fractional inhibitory concentration index, FIC)为联合药敏试验的判断依据。按照以下公式计算  $FIC$ :  $FIC = A/A' + B/B'$ 。式中,  $A$  表示甲药联合时的  $MIC$ ,  $A'$  表示甲药单独时的  $MIC$ ,  $B$  表示乙药联合时的  $MIC$ ,  $B'$  表示乙药单独时的  $MIC$ 。当  $FIC \leq 0.5$  时,为协同作用;当  $FIC > 0.5 \sim 1$  时,为相加作用;当  $FIC > 1 \sim 2$  时,为无关作用;当  $FIC > 2$  时,为拮抗作用<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 最低抑菌浓度的测定结果 三黄汤对大肠杆菌 ATCC-

表2 三黄汤、环丙沙星联合用药对大肠杆菌的药敏试验

环丙沙星浓度 $\mu\text{g}/\text{ml}$	三黄汤浓度//mg/ml								环丙沙星 单药对照
	900	450	360	270	225	180	112.5	56.25	
31.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.51	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9.38	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7.82	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3.91	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1.96	-	-	-	+	+	+	+	+	+
三黄汤单药对照	-	-	+	+	+	+	+	+	阳性对照(+)

### 2.3 在亚 $MIC$ 浓度下用三黄汤与环丙沙星培养的抑菌曲线

在亚  $MIC$  三黄汤作用下其抑菌曲线较为平稳,与对照组相比,7 h 内 *E. coli* 未见明显增长,一直以微弱的抑菌作用抑制大肠杆菌的增长,7 h 后开始有缓慢增长的趋势;在 Sub- $MIC$  环丙沙星作用下,3~4 h 后降至  $10^3$  以下,说明大肠杆菌明显受到抑制,4 h 达到最低水平,但随后又增长至接种水平,可能是由于存在于原培养基中的抗药菌株增值所致;组合药物对大肠杆菌表现为协同作用,4 h 内主要表现环丙沙星的高效抑菌作用,随后随着用药时间的增加,菌落数量增加,10 h 后保持稳定,但其抑菌作用始终强于单药。

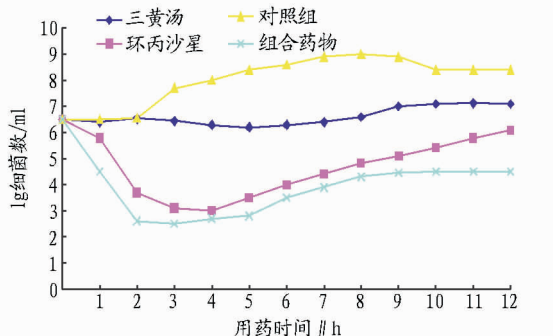


图1 亚  $MIC$  浓度下的三黄汤、环丙沙星及组合药物对 *E. coli* 的抑菌曲线

25922D 的  $MIC$  值为 450 mg/ml,环丙沙星为 15.63  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,二者相差较远,表明中草药比抗菌药物的其抑菌作用弱。当环丙沙星对大肠杆菌的  $MIC$  值  $\geq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$  时为耐药<sup>[10]</sup>,说明大肠杆菌对环丙沙星为耐药。通过 Sub- $MIC_{20}$  代传代培养后,三黄汤对大肠杆菌的  $MIC$  值为 440 mg/ml,较为稳定;环丙沙星对大肠杆菌的  $MIC$  值为 90.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,较原始菌株提高了 6 倍左右,这与临床上的长期服用一种抗生素所出现的抗药性相近;提取一定浓度在最佳组合药物培养下的大肠杆菌,测得环丙沙星对大肠杆菌的  $MIC$  值为 11.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

表1 三黄汤与环丙沙星对大肠杆菌的  $MIC$  值 mg/ml

药物	$MIC$ 值	Sub- $MIC_{20}$ 代 后 $MIC$ 值	组合药物培养 20 代后 $MIC$ 值
三黄汤	450	440	435
环丙沙星	0.015 6	0.090 7	0.011 4

### 2.2 三黄汤、环丙沙星联合用药对大肠杆菌的药敏试验

三黄汤与环丙沙星联合用药对大肠杆菌 ATCC25922 的  $FIC < 0.5$ ,二者联合结果为协同作用,因此 2 种药物联用能够提高抗菌作用。

## 3 讨论

从三黄汤与环丙沙星对大肠杆菌的  $MIC$  值可以看出,环丙沙星对大肠杆菌的药敏性远高于三黄汤。但是在亚  $MIC$  下转接 20 代后,环丙沙星  $MIC$  值增至原来的 6 倍左右,说明长时间使用抗生素易使细菌产生抗药性,使得抗药菌株增多。因此,若要达到抑菌效果,就必须不断增大药物剂量,这就为其临床用药带来一定的困扰;三黄汤对大肠杆菌的抗菌活性虽不强,但经过 20 代持续培养后, $MIC$  值不但没有增加,反而有略微下降的趋势,说明大肠杆菌很难对三黄汤产生抗药性。这可能是由于三黄汤与环丙沙星抑菌机制存在显著差异,三黄汤的复杂成分的理化作用构成三黄汤的综合抑菌机制,是全面、持续性的,完全不同于环丙沙星的双靶位抑菌机制。在单药治疗大肠杆菌时一般优先选用环丙沙星,但是易产生抗药性,不宜通过大幅度提高剂量来提高其治疗效果<sup>[11]</sup>。

通过不同梯度组合培养,测得最佳药物组合浓度为三黄汤 112.5 mg/ml、环丙沙星 9.38  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,三黄汤与环丙沙星联合用药的  $FIC$  指数  $< 0.5$ ,表现为协同作用,其原因可能是因为二者的作用机理存在相互影响。环丙沙星作用的是 2 个靶点,分别为拓扑异构酶 II 和拓扑异构酶 IV,这 2 种酶是细菌生存所必需的酶,在细菌复制、修复、转录中发挥重要作用,环丙沙星通过与这 2 种酶分别形成环丙沙星-DNA 促旋酶

-DNA 复合体,起到杀菌作用<sup>[12]</sup>;三黄汤是水煎中草药提取物,成分复杂,主要通过小檗碱等持续缓释和化学作用,抑制大肠杆菌的增长,但小檗碱溶解度低,会随着小檗碱被细菌的消耗而逐步释出,从而实现持续抑菌。荧光光谱分析表明,其抑菌机理可能是小檗碱的异喹啉端插入到 DNA 双螺旋的沟槽中,抑制 DNA 的复制和转录<sup>[13]</sup>;另外,三黄汤有可能对细胞膜的通透性存在一定的影响<sup>[2]</sup>,其中某种组分有可能使得大肠杆菌细胞膜的通透性改变,在较低浓度下细胞膜通透性大,使得外膜抵御外来毒物的能力增加,这样环丙沙星进入细胞内的概率增加,有利于环丙沙星与细菌 DNA 回旋酶结合,从而提高抑菌作用;也可能是三黄汤中某种组分对已产生抗环丙沙星抗药性的大肠杆菌具有明显的消除抗药性作用,目前认为对大肠杆菌携带的耐药性 R 质粒有一定消除作用<sup>[14]</sup>。在组合药物条件下转接 20 代后的大肠杆菌对环丙沙星的 MIC 值降至 11.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,对三黄汤的 MIC 值下降较为微弱,很有可能是由于联合用药,对大肠杆菌的抗药机制产生改变,因而联合用药能提高环丙沙星的抗菌效能,但是中药复方与抗生素协同机理复杂,还需进一步探讨。

### 参考文献

[1] 罗音久,曾中良,杨俊卿. 中药消除大肠杆菌对喹诺酮类耐药性的研究作用[J]. 中国畜牧兽医杂志,2006(5):7-9.

- [2] 芦亚君,程宁. 3 种中药方剂逆转大肠杆菌耐药性的实验观察[J]. 西北药学杂志,2007,13(6):309-311.
- [3] KWON H A, KWON Y J, KWON D Y, et al. Evaluation of antibacterial effects of a combination of *Coptidis Rhizoma*, *Mume Fructus*, and *Schizandrae Fructus* against *Salmonella*[J]. *International Journal of Food Microbiology*,2008,127:180-183.
- [4] 张传津,都业良,彭媛芳,等. 六种中药提取物消除大肠杆菌耐药性的研究[J]. 山东畜牧兽医,2012,33(7):8-10.
- [5] 尉景娟,李惠芬,苏建荣. 八种中药单体对产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希杆菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体外抑菌活性研究[J]. 中华临床医师杂志,2011(2):164-166.
- [6] 张传美,刘宁波,于淼. 庆大霉素、三黄汤和小檗碱对 *E. coli* 抑菌作用研究[J]. 莱阳农学院学报,2004(1):14-17.
- [7] 晁利刚,谷晓霞,胡功政,等. 环丙沙星与黏菌素联合对猪大肠杆菌的体外抗菌研究[J]. 江西农业学报,2009,21(1):102-104.
- [8] 杜冬冬,王涛,常维山. 五种抗生素联合应用对大肠杆菌效果实验[J]. 中国兽药杂志,2012,46(6):14-16.
- [9] WIKLER M A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[M]. Clinical and Laboratory Standards Institute,2006.
- [10] 刘荣欣,鲁改儒,郭吉勇. 中药及其组方对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 安徽农业科学,2011,39(4):2265-2267.
- [11] 蒋红,王宏军,周铁军,等. 四黄止泻颗粒中六味中药互相配伍对鸡大肠杆菌的作用研究[J]. 中国农学通报,2012,28(14):89-92.
- [12] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2001:234-237.
- [13] 骆和生,罗鼎辉. 免疫中药学[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1999.
- [14] TRAN J H, JACOBY G A, HOOPER D C. Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2005,49(1):118-125.

(上接第 614 页)

**2.2 新城疫抗体水平与试验鸡抗病性的关系** 将鸡新城疫抗体水平与试验鸡抗病/易感性进行相关性分析,结果表明 3 个品种试验鸡的新城疫抗体水平与抗大肠杆菌病抗性呈中等程度正相关,相关系数均在 0.60 左右。

表 1 抗大肠杆菌病抗病鸡与易感鸡的新城疫抗体水平比较

项目	麻黄鸡	杂交鸡	红宝鸡
抗病个体	6.20 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	6.00 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	8.20 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>
易感个体	5.40 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	5.20 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	7.20 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

直接检测大肠杆菌抗体水平能更好地反映鸡对大肠杆菌病的抵抗力,但是大肠杆菌血清型众多,抗体水平不容易检测,而鸡新城疫抗体水平是养殖场日常监测的常规项目,操作简单、方便又经济。另外,根据 R. Yunis 等的研究报道<sup>[10]</sup>可知,新城疫抗体水平较高的个体,其大肠杆菌抗体水平也较高,二者存在很强的正相关。基于此,笔者才选择 NDV Ab 作为禽抗大肠杆菌病的免疫遗传标记。

感染性疾病不仅受病原体的毒力和环境因素的控制,而且受到遗传基因及其多态性以及免疫应答的影响<sup>[1-5]</sup>。许

多研究表明通过遗传选择改变免疫生理是可行的<sup>[5]</sup>。该研究结果表明,新城疫抗体水平与抗大肠杆菌病抗性呈中等程度正相关。因此,可以利用新城疫抗体作为免疫遗传标记,对大肠杆菌抗病性进行标记辅助选择(MAS),通过抗病育种手段来加强对大肠杆菌病的控制。

### 参考文献

- [1] 王文君,黄路生. 畜禽抗病育种的研究进展[J]. 畜禽业,2000(6):14-16.
- [2] KAIS P. 宿主抗病性的遗传学研究[J]. 中国家禽,2011,33(22):40.
- [3] 叶湘海,刘娟. 鸡的抗病遗传研究进展[J]. 当代畜牧,1993(3):2-4.
- [4] 刘定发. 家禽遗传抗病研究的进展及应用前景[J]. 畜禽业,1999(8):16-17.
- [5] LAMONT S J. Lamont. Impact of genetics on disease resistance[J]. *Poultry Science*,1998,77:1111-1118.
- [6] CALNEK B W. 禽病学[M]. 高福,苏敬良,译. 10 版. 北京:中国农业出版社,1999:158-171.
- [7] 周渝,刘海燕,张平,等. 禽大肠杆菌病流行情况及防治研究进展[J]. 畜牧市场,2009(12):25-27.
- [8] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1987:351-353.
- [9] 周秀红,祁克宗,张丽霞,等. 不同接种途径对人工诱发鸡大肠杆菌病的影响[J]. 安徽农业大学学报,2005,32(4):463-466.
- [10] YUNIS R, BEN-DAVID A, HELLER E D. Immunocompetence and Viability Under Commercial Conditions Of Broiler Groups Differing in Growth Rate and in Antibody Response to *Escherichia coli* Vaccine[J]. *Poultry Science*,2000,79:810-816.