

# 含珠草水提取物与抗菌药联用对含 *fosA3* 耐药基因大肠杆菌的抑菌效果研究

姚晓韵,宋剑武,夏娟,秦燕,黄丽云,李海燕,黄凯,司红彬\*  
(广西大学 动物科学技术学院,广西 南宁 530005)

**摘要:**为探讨含珠草水提取物与抗菌药物联用体外抗含 *fosA3* 耐药基因大肠杆菌的效果,对临床分离的细菌进行鉴定,确定细菌所含耐药基因种类,采用 96 孔反应板二倍微量稀释法分别检测含珠草水提取物与抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC),以 1/2 MIC 的含珠草水提取物与抗菌药联合诱导含 *fosA3* 耐药基因大肠杆菌,并进行传代试验,采用微量棋盘稀释法测定含珠草水提取物与抗菌药联合作用后的部分抑菌浓度指数(FICI)。结果显示,分离到的菌株为含 *fosA3* 耐药基因大肠杆菌;含珠草水提取物的 MIC 为 0.5 g/mL,以 0.25 g/mL 的含珠草水提取物与 14 种抗菌药联合使用 3 代后,14 种抗菌药的 MIC 显著降低,均降到 1.562 5 以下;含珠草水提取物与头孢曲松钠、磷霉素、黏杆菌素、磺胺间甲氧嘧啶、头孢他啶、头孢噻唑钠联合应用后其 FICI 均小于等于 0.5,与阿莫西林、环丙沙星、诺氟沙星、左旋氧氟沙星、痢菌净、克林沙星、阿米卡星、氟苯尼考联合应用后 FICI 均大于 0.5 且小于 1。表明,含珠草水提取物与抗菌药联合应用后,抗菌药体外抗菌活性显著增强,二者之间具有协同或相加作用。

**关键词:**含珠草;抗菌药;*fosA3* 基因;联合诱导;最小抑菌浓度;部分抑菌浓度指数

**中图分类号:**S859.3      **文献标志码:**A      **文章编号:**1004-3268(2015)03-0139-05

## Effect of *Copperleaf* Water Extractions Combined with Antibacterial Agents on *Escherichia coli* Containing Fosfomycin Resistance Gene *FosA3*

YAO Xiaoyun, SONG Jianwu, XIA Juan, QIN Yan, HUANG Liyun, LI Haiyan, HUANG Kai, SI Hongbin  
(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract:** This research was aimed to investigate the effect of *Copperleaf* water extracts combined with antibiotics against bacteria carrying multidrug resistance gene *fosA3* *in vitro*. Resistance gene types were determined by identification of bacteria isolated in clinics. The minimal inhibitory concentration (MIC) of water extracts of *Copperleaf* and antibacterial agents were tested through twice micro-dilution method. *Escherichia coli* containing *FosA3* were induced and subcultured by the 1/2 MIC of water extracts of *Copperleaf* combined with antibacterial agents. Fractional inhibitory concentration indexes (FICI) of extracts combined with antibacterial agents were determined by microdilution checkerboard techniques. The results showed that *Escherichia coli* carrying multidrug resistance gene *fosA3* was isolated. The MIC of water extracts from *Copperleaf* was 0.5 g/mL, the MIC of antimicrobial significantly decreased and all fell below

收稿日期:2014-09-16

基金项目:国家科技支撑计划项目(2012BAD25B04);国家自然科学基金项目(31460675);广西科技攻关项目(0992014-2);广西自然科学基金项目(2012GXNSFBA053052,2013GXNSFAA019070);广西大学兽医一级学科博士启动基金项目;广西大学大学生实验技能和科技创新能力训练项目(SYJN20131728);南宁市科技攻关项目(20141295,201102100G);广西高校优势特色专业建设项目

作者简介:姚晓韵(1993-),女,广西柳州人,在读本科生,研究方向:中兽医药。E-mail:1219208051@qq.com

\* 通讯作者:司红彬(1977-)男,河南商丘人,副教授,博士,主要从事细菌耐药性研究。E-mail:zhuli\_2009@163.com

1.562 5 after 3 times of passages by 0.25 g/mL extracts combined with 14 antimicrobial. When *Copperleaf* water extracts were applied with ceftriaxone sodium, fosfomycin, colymycin, sulfamonomethoxine, ceftazidime and ceftiofur sodium, the FICI were less than or equal to 0.5. And with amoxicillin, ciprofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, mequinolox, cinafloxacin, amikacin, and florfenicol, the FICI were more than 0.5 and less than 1. The antibacterial activities of antibacterial agents against the *FosA3* from *Escherichia coli* were enhanced significantly by water extracts of *Copperleaf*, and showed additive effect or synergistic activity correlation.

**Key words:** *Copperleaf*; antibiotics; *fosA3* gene; combined induction; minimal inhibitory concentration; FICI

近年来广谱抗菌药的滥用以及细菌间耐药基因的传播,导致耐药菌株增多,对常用抗菌药物耐药现象严重。研究表明<sup>[1]</sup>,质粒介导的磷霉素耐药基因(*fosA3 fosC2*)可以通过直接与人体接触传播或者间接地通过食物链向人体进行传递,加剧了细菌耐药问题的严重性。中药成分复杂,疗效持久稳定,细菌不易产生耐药性,近年来以中药逆转细菌耐药性和中西药联合抗菌成为研究重点<sup>[2-3]</sup>。含珠草因其形如蚌含珠得名,别名叶里藏珠、血见愁、铁苋菜,属大戟科(*Euphorbiaceae*)铁苋菜属(*Acalypha* L.)植物,主要含有铁苋菜素、黄酮、生物碱、没食子酸和鞣质等有效成分,有清热利湿、凉血解毒、止痢、止血等功效,临床上应用广泛<sup>[4-5]</sup>。前人研究发现,含珠草提取物抗菌谱广,对藤黄八叠球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、黄曲霉以及大肠杆菌、沙门氏菌等多种革兰氏阴性菌均有不同程度的抑菌效果<sup>[2,6-7]</sup>;对大肠杆菌、甲氧西林金黄色葡萄球菌及对氯霉素、氨苄西林及磺胺甲基异恶唑耐药的沙门氏菌等也均有抑制作用<sup>[8]</sup>。此外,从含珠草分离得到的 3 种三萜类化合物对耐万古霉素肠球菌具有抗菌活性<sup>[9]</sup>。目前,关于含珠草联合抗菌药物的抗菌试验尚未见报道。为此,研究了含珠草水提取物和 14 种抗菌药物联合应用后对该耐药菌株的体外抑制作用,采用微量棋盘稀释法测定二者联用后的部分抑菌浓度指数以判断二者之间的药效关系,为进一步研究含珠草对其他耐药细菌的防治提供参考,为含珠草的开发利用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

含珠草(批号 20111206)购自广西万丰药业有限公司;MH 肉汤、MH 琼脂、普通琼脂、SS 琼脂、麦康凯琼脂、营养肉汤、生化试剂均购自杭州天和微生物试剂有限公司;Taq 酶、dNTP、10 × PCR Buffer 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;抗菌药均为国产药且在有效期内,分别为头孢曲松钠、阿莫西

林、环丙沙星、诺氟沙星、左旋氧氟沙星、磷霉素、黏杆菌素、痢菌净、克林沙星、磺胺间甲氧嘧啶、阿米卡星、头孢他啶、头孢噻唑钠、氟苯尼考。

### 1.2 菌株分离鉴定

无菌采集病猪的肠道组织接种于平板培养基,37 ℃ 培养 18 ~ 24 h,挑取可疑菌落分别接种于 SS 琼脂平板和麦康凯琼脂平板进行培养。按常规方法对所有分离株进行三糖铁试验、糖发酵试验、吲哚试验、MR 试验、V - P 试验、枸橼酸钠利用试验、明胶液化试验、脲酶试验。细菌学检查、生化鉴定方法及结果判定标准依据文献[10 - 11]的方法进行。

### 1.3 *fosA3* 基因的检测

1.3.1 引物 参照 GenBank 中的 *fosA3* 基因(JX442754.1)序列设计 *fosA3* 引物,FosA3 - F: 5' - GCGTCAAGCCTGGCATT - 3'; FosA3 - R: 3' - GC-CGTCAGGGTCGAGAAA - 5'。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,扩增长度为 258 bp。

1.3.2 PCR 扩增 50 μL 反应体系为: Taq 酶 0.5 μL, dNTP 4 μL, 10 × PCR Buffer 5 μL, 模板 DNA 2 μL, 上、下游引物各 2 μL, 去离子水 34.5 μL<sup>[12]</sup>。反应参数为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外投射仪下观察结果并用凝胶成像系统摄像。

### 1.4 含珠草水提取物制备

称取含珠草 100 g, 用蒸馏水清洗、浸泡 12 h 后煎煮, 第 1 次加蒸馏水为 1 000 mL, 加热至沸腾改为文火, 保持沸腾状态煎煮 60 min, 过滤后为第 1 次滤液。用相同方法继续煎煮, 第 2 次水量 800 mL, 第 3 次水量 600 mL, 得到第 2、3 次滤液。合并 3 次滤液, 加热蒸发浓缩到 100 mL, 此时中药质量浓度为 1 g/mL。药液高压灭菌后冷藏备用。

### 1.5 中药水提物与抗菌药联合抗菌研究的试验方法

1.5.1 含珠草水提取物和抗菌药最小抑菌浓度(MIC)检测 参照文献[13 - 14]中的二倍微量稀

释法测定各受试药对细菌的 MIC。细菌经活化后,培养至生长对数期,将其稀释至含量为  $10^6$  cfu/mL 的细菌悬液。取 100  $\mu$ L 于微量药敏反应板的第 1 孔内,之后每孔加入 100  $\mu$ L 至第 12 孔,在第 1 孔加入 100  $\mu$ L 药液,混匀后吸取 100  $\mu$ L 至第 2 孔,依次稀释混匀至第 11 孔,第 11 孔混匀后丢弃 100  $\mu$ L,第 12 孔没有加药作为空白对照,加盖于 37  $^{\circ}$ C 恒温箱内培养 16~18 h。

1.5.2 中西联合药物诱导细菌传代 以含珠草水提取物亚抑菌浓度联合抗菌药诱导耐药菌传代培养 3 代,比较联合传代作用后的 MIC 值与单独使用抗菌药的 MIC 值,确定联合传代作用后的 MIC 值是否变小,以判断水提取物联合抗菌药对该耐药菌传代培养有无抑制作用。

1.5.3 微量棋盘稀释法测定药效 以药物单用时的 MIC 为基础,将一种药物以 4 倍 MIC 的剂量沿 96 孔平板的纵向设置 2 倍倍比稀释梯度,与之联合的另一种药物在平板的横向进行倍比稀释。然后向各孔中加入培养至对数期的菌液用 MH 肉汤调至  $10^6$  cfu/mL,另外设置不加药物的空白对照组,加盖于 37  $^{\circ}$ C 恒温箱内培养 16~18 h。这一方法使得 2 种药物的 MIC 倍比稀释梯度在 96 孔平板上进行交叉配合,包含了 2 种药物多种剂量组合。选择最佳组合效应时两药联用时各自的 MIC 值,计算部分抑菌浓度指数(FICI)来判断药物相互作用效应。计算公式:

$$FICI = FICIA + FICIB = \frac{A \text{ 药联合用时的 MIC(联合)}}{A \text{ 药单用时的 MIC(单用)}} + \frac{B \text{ 药联合用时的 MIC(联合)}}{B \text{ 药单用时的 MIC(单用)}}$$
。结果判定: $FICI \leq 0.5$  为协同效应, $0.5 < FICI \leq 1$  为相加效应, $1 < FICI \leq 2$  为无关作用, $FICI > 2$  为拮抗效应<sup>[15]</sup>。

2 结果与分析

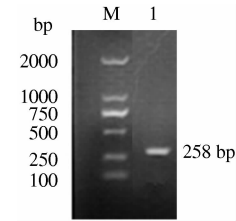
2.1 细菌分离鉴定结果

从病猪肠道分泌物中分离到 1 株细菌分离物,培养 24 h 后,在麦康凯琼脂平板上可见有玫红色、圆形、表面光滑的菌落,SS 琼脂平板上也有红色菌落生长。从麦康凯琼脂平板上挑取典型菌落,分别接种于普通琼脂平板和血液琼脂平板上培养 24 h,可见有灰白色隆起、湿润、光滑、直径约在 1~3 mm 的菌落。

将纯化后的细菌分别接种系列生化培养基。结果显示,该菌能分解葡萄糖、乳酸、甘露醇、麦芽糖,产酸产气;不分解肌醇和尿素;不产生硫化氢;MR 试验阳性;V-P 试验阴性;枸橼酸盐利用试验阴性;不液化明胶。综上,分离菌为大肠杆菌。

2.2 PCR 检测结果

PCR 检测结果显示,该菌含 *fosA3* 基因,片段大小为 258 bp(图 1)。



M. Marker; 1. *fosA3* 基因  
图 1 PCR 扩增电泳结果

2.3 单药及含珠草水提取物与抗菌药联合作用的抑菌效果

测定结果显示,含珠草水提取物 MIC 为 0.5 g/mL。由表 1 可知,单独使用各种抗菌药 MIC 值较大。供试

表 1 单药及含珠草水提取物与抗菌药联合应用的 MIC μg/mL

抗菌药	单独使用抗菌药	与含珠草水提取物联合诱导传代		
		第 1 代	第 2 代	第 3 代
头孢曲松钠	3 200	800	100	<1.562 5
阿莫西林	1 600	1 600	1 600	<1.562 5
环丙沙星	25	25	3.125	<1.562 5
诺氟沙星	100	100	25	<1.562 5
左旋氧氟沙星	50	50	3.125	<1.562 5
磷霉素	3 200	3 200	25	<1.562 5
黏杆菌素	3 200	3 200	3.125	<1.562 5
痢菌净	400	400	<0.781 3	<0.781 3
克林沙星	50	50	50	<0.781 3
磺胺间甲氧嘧啶	3 200	3 200	12.5	<1.562 5
阿米卡星	3 200	3 200	3.125	<1.562 5
头孢他啶	3 200	3 200	100	<1.562 5
头孢噻吩钠	1 600	1 600	100	<1.562 5
氟苯尼考	1 280	1 280	160	<1.25

菌对头孢曲松钠、阿莫西林、磷霉素、黏杆菌素、磺胺间甲氧嘧啶、阿米卡星、头孢他啶、头孢噻呋钠、氟苯尼考具有很强的耐药性,各抗菌药的 MIC 值均达到 1 280 g/mL 以上,根据标准可判断该菌对受试的各抗菌药均表现为耐药。与含珠草水提取物联合培养传代后的 MIC 值普遍减小,由原来的高度耐药或耐药转为敏感,表现出抑菌作用。由于药效发挥时间的差异性,其中头孢曲松钠从第 1 代就开始变小,环丙沙星、诺氟沙星、左旋氧氟沙星、磷霉素、黏杆菌素、痢菌净、磺胺间甲氧嘧啶、阿米卡星、头孢他啶、头孢噻呋钠、氟苯尼考从第 2 代开始变小,阿莫西林、克林沙星 MIC 值从第 3 代开始变小。可见,含

珠草水提取物对含 *fosA3* 耐药基因大肠杆菌具有耐药逆转,从而起到抑菌作用。

2.4 含珠草水提取物与抗菌药联用抗菌结果

由表 2 可知,含珠草水提取物与头孢曲松钠、磷霉素、黏杆菌素、磺胺间甲氧嘧啶、头孢他啶、头孢噻呋钠联合应用后 FICI ≤ 0.5 (分别为 0.500、0.500、0.281、0.375、0.187、0.500),表明具有协同作用,与头孢他啶的协同作用最大;含珠草水提取物与阿莫西林、环丙沙星、诺氟沙星、左旋氧氟沙星、痢菌净、克林沙星、阿米卡星、氟苯尼考联合应用后 FICI 均大于 0.5 且小于 1 (分别为 0.750、0.625、0.531、0.625、0.750、0.625、0.625、0.625),表明具有相加作用。

表 2 含珠草水提取物与抗菌药联用抗菌结果

药物	单药 MIC	联合用药 MIC	FICI	抗菌作用
含珠草水提取物	0.5	0.125	0.500	协同
头孢曲松钠	3 200	800		
含珠草水提取物	0.5	0.125	0.750	相加
阿莫西林	1 600	800		
含珠草水提取物	0.5	0.062 5	0.625	相加
环丙沙星	25	12.5		
含珠草水提取物	0.5	0.012 625	0.531	相加
诺氟沙星	100	50		
含珠草水提取物	0.5	0.062 5	0.625	相加
左旋氧氟沙星	50	25		
含珠草水提取物	0.5	0.125	0.500	协同
磷霉素	3 200	800		
含珠草水提取物	0.5	0.012 625	0.281	协同
黏杆菌素	3 200	800		
含珠草水提取物	0.5	0.125	0.750	相加
痢菌净	400	200		
含珠草水提取物	0.5	0.062 5	0.625	相加
克林沙星	50	25		
含珠草水提取物	0.5	0.062 5	0.375	协同
磺胺间甲氧嘧啶	3 200	800		
含珠草水提取物	0.5	0.062 5	0.625	相加
阿米卡星	3 200	1 600		
含珠草水提取物	0.5	0.062 5	0.187	协同
头孢他啶	3 200	400		
含珠草水提取物	0.5	0.125	0.500	协同
头孢噻呋钠	1 600	400		
含珠草水提取物	0.5	0.062 5	0.625	相加
氟苯尼考	1 280	640		

注:含珠草水提取物 MIC 单位为 g/mL,抗菌药 MIC 单位为 μg/mL。

3 结论与讨论

本试验将含珠草水提取物与抗菌药联合作用于含 *fosA3* 耐药基因的大肠杆菌,结果显示,含珠草水提取物与抗菌药联合传代后 MIC 值显著降低,与头孢曲松钠、磷霉素、黏杆菌素、磺胺间甲氧嘧啶、头孢他啶、头孢噻呋钠之间存在协同效应,与阿莫西林、

环丙沙星、诺氟沙星、左旋氧氟沙星、痢菌净、克林沙星、阿米卡星、氟苯尼考之间存在相加效应。本试验采用微量棋盘稀释法来测定药物联合体外杀菌效果,除此以外常用的方法还有纸片扩散法、微量试管稀释法等。棋盘法操作简便、结果易于分析、准确性高、重复性好<sup>[16]</sup>,但试验结果不易观察,尤其中药成分颜色较深,在 96 孔微量反应板上的结果观察不易,且不能反映药物药效随时间的变化过程,存在一

定的局限性。因此,在以后的深入研究中可综合采用多种方法。

研究<sup>[17]</sup>表明,中药对细菌不易产生耐药性,有逆转耐药的作用,其逆转耐药的机制主要有抑制耐药基因表达、抑制细菌外排机制、消除 R 质粒等。前人测定了含珠草的有效成分<sup>[18]</sup>,但有关含珠草逆转细菌耐药性方面的研究尚未报道,本研究结果表明,含珠草水提取物与抗菌药存在协同或相加作用,能够逆转细菌耐药性,其机制有待进一步研究。本研究仅限于体外抑菌试验,含珠草在体内的作用机制比体外复杂,且临床多采用复方治疗,因此含珠草水提取物在体内能否达到与体外相同的抑菌效果尚无定论,下一步应深入研究含珠草体内抗菌作用、作用机制以及有效成分。

中药联合抗菌药使用,能达到标本兼顾、增强疗效的效果,且能减少抗菌药用量,从而降低不良反应,甚至能够逆转细菌对某些抗菌药的耐药性。临床上可以缩短治疗时间、提高治愈率,减少并发症和畜禽养殖场感染,在预防和治疗由耐药菌引起的疾病等方面具有很大价值。因此,中西药物联合治疗应用前景广阔,值得深入研究、开发和利用。

#### 参考文献:

- [1] Hou J, Huang X, Deng Y, *et al.* Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M beta-lactamase genes and *rmtB* carried on IncF II plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China[J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2012, 56: 2135-2138.
- [2] 向秋玲. 铁苋菜不同溶剂提取物抑菌作用的研究[J]. *江苏农业科学*, 2010(4): 360-362.
- [3] 毛理纳, 罗予, 胡新辉, 等. 黄连和大黄联合头孢他啶体内外抗菌作用[J]. *中药药理与临床*, 2006, 22(2): 38-39.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 724-725.
- [5] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志第四十四卷[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 98.
- [6] 游兰英. 铁苋菜体外抗菌作用研究[J]. *海峡药学*, 1996, 8(2): 7-9.
- [7] 梁曾恩妮, 蒋道松, 刘作梅, 等. 铁苋菜总黄酮提取工艺优化及其抑菌效果的初步鉴定[J]. *湖南农业科学*, 2008, 38(2): 110-112.
- [8] Bssing A, Stein G M, Herterich-Akinpelu, *et al.* Apoptosis-associated generation of reactive oxygen intermediates and release of pro-inflammatory cytokines in human lymphocytes and granulocytes by extracts from the seeds of *Acalypha wilkesiana* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 66(3): 301-309.
- [9] Gutierrez-Lugo M T, Singh Maya P, Maiese William M, *et al.* New antimicrobial cycloartane triterpenes from *Acalypha communs* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(6): 872-875.
- [10] 张致平. 微生物药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [11] 赵波, 李波, 王强, 等. 4个动物园灵长类动物肠道克雷伯氏菌的分离鉴定与药敏试验[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(2): 161-165.
- [12] 苑丽, 刘建华, 胡功政, 等. 30株鸡大肠杆菌 ESBLs 基因型检测鸡耐药性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(6): 438-442.
- [13] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th informational supplement [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- [14] 宗淑杰, 吴明江, 秦银河, 等. 医家金鉴·检验医学卷(下)[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2007.
- [15] Lin E, Stanek R J, Mufson M A. Lack of synergy of erythromycin combined with penicillin or cefotaxime against *Streptococcus pneumoniae in vitro* [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2003, 47(3): 1151-1153.
- [16] 李妍, 郭琼杰, 孙淑娟. 抗真菌药物联合应用的体外药效评价方法[J]. *抗感染药学*, 2007, 4(2): 51-55.
- [17] 王静, 张淑文. 中药逆转细菌耐药的研究进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2007, 6(1): 153-155.
- [18] Amakura Y, Miyake M, Ito H, *et al.* Acalyphidins M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, and D<sub>1</sub>, ellagitannins from *Acalyp hahispida* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(4): 667-675.