

论著·临床研究

小檗碱体外逆转耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌耐药性研究

刘心伟¹, 王志盛², 许晓娜², 张小倩^{1,2}, 李永伟^{1,2△}

(1. 河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院检验科, 河南郑州 450002;

2. 河南中医药大学, 河南郑州 450008)

摘要:目的 评估小檗碱对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌(CRPA)体外抗菌活性和耐药性逆转能力, 为小檗碱用于治疗 CRPA 感染提供依据。方法 收集河南省中医院临床微生物实验室 2017 年 1—12 月分离的 CRPA 临床分离株, 采用二倍肉汤稀释法检测 CRPA 对小檗碱的最小抑菌浓度(MIC), 评估小檗碱抑菌活性; 棋盘法检测小檗碱与哌拉西林等 5 种抗菌药物的协同抑菌活性; K-B 法检测 CRPA 经小檗碱逆转前后抑菌圈变化, 评估小檗碱的耐药性逆转能力。结果 79 株 CRPA 临床分离株对小檗碱的 MIC 为 (1.67 ± 0.55) mg/mL; 经小檗碱逆转前后, CRPA 对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、亚胺培南和美罗培南的抑菌环直径差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 对头孢吡肟、阿米卡星、环丙沙星和多黏菌素 B 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 小檗碱对 CRPA 具有较好的抑菌活性, 与哌拉西林、头孢他啶和亚胺培南具有协同抑菌作用, 可逆转 CRPA 对部分抗菌药物的耐药性, 但具体机制有待进一步深入研究。

关键词: 小檗碱; 碳青霉烯类药物; 铜绿假单胞菌; 药物敏感性试验; 耐药性逆转

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.24.015

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2018)24-3050-04

文献标识码: A

Resistance reverse of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* by berberine in vitroLIU Xinwei¹, WANG Zhisheng², XU Xiaona², ZHANG Xiaoqian^{1,2}, LI Yongwei^{1,2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Henan Province Hospital of TCM/Second Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Henan University of TCM, Zhengzhou, Henan 450008, China)

Abstract: **Objective** To evaluate antimicrobial activity and resistance reversal ability of berberine to carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa (CRPA) in vitro, and provide basis for the CRPA infection treatment with berberine. **Methods** Clinical isolates of CRPA from January 2017 to December 2017 were collected from clinical microbiology laboratory of Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine. The broth dilution test was applied to detect the MIC of CRPA to berberine and checkerboard method to detect the synergistic antibacterial activity of berberine with five antibiotics including piperacillin. In order to evaluate the resistance reverse ability of berberine, K-B disc diffusion method was used to detect the changes of the antibacterial circle of CRPA before and after the berberine reverse. **Results** The MIC of 79 CRPA clinical isolates to berberine was (1.67 ± 0.55) mg/mL. Before and after the reversal of berberine, CRPA showed statistically significant differences in the diameter of the antibacterial ring between piperacillin, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, imipenem and meropenem ($P < 0.05$), and no statistical significance for cefepime, amikacin, ciprofloxacin and polymyxin B ($P > 0.05$). **Conclusion** Berberine showed good antibacterial activity to CRPA and synergistic antibacterial activity with piperacillin, ceftazidime and imipenem. It also can reverse the resistance of CRPA to some antibiotics, but the exact mechanism needs to be further studied.

Key words: berberine; carbapenem; *Pseudomonas aeruginosa*; antimicrobial susceptibility test; resistance reverse

铜绿假单胞菌(PA), 俗称绿脓杆菌, 属于革兰阴性非发酵菌, 是引起医院 ICU 和神经外科等重症科室

作者简介: 刘心伟, 男, 主管技师, 主要从事临床微生物检验研究。△ 通信作者, E-mail: liyw71@126.com。

本文引用格式: 刘心伟, 王志盛, 许晓娜, 等. 小檗碱体外逆转耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌耐药性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(24): 3050-3052.

院内感染的重要病原菌之一,常引起呼吸道感染、烧伤创面感染和败血症等。随着广谱抗菌药物在临床上的广泛使用,尤其是碳青霉烯类药物的应用,导致近年来耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌(CRPA)的分离率呈逐年上升趋势,成为临床抗感染治疗的棘手问题。中药用于感染性疾病治疗历史悠久,具有疗效确切,毒副作用小等优点。不少清热燥湿类中药除对细菌具有直接的抑菌和杀菌作用外,还能逆转多重耐药菌的耐药性,恢复其对抗菌药物的敏感性。为探讨清热燥湿类中药对 CRPA 的耐药性逆转作用,本研究选取黄连的提取物小檗碱作为研究对象,利用二倍稀释法进行 CRPA 对黄连素的药敏性测定,进而使用黄连素对 CRPA 进行耐药性逆转试验,旨在为临床治疗 CRPA 造成的感染提供实验依据和治疗思路。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集河南省中医院临床微生物实验室 2017 年 1—12 月分离的 CRPA 临床分离株(剔除同一患者同一部位重复分离菌株),菌种鉴定和药敏试验由法国梅里埃 VITK2-Compact 全自动微生物鉴定与药敏系统完成。标本构成:痰液 63 株,尿液 7 株,伤口分泌物 4 株,血液 5 株。CRPA 判定标准参照相关文献标准进行^[1]。质控菌株 ATCC27853,购自河南省临床检验中心。

1.2 中药单体、抗菌药物和试剂 小檗碱标准品,CAS:5086-83-1,货号:SB8130,纯度≥98%(HPLC);亚胺培南标准品,CAS:64221-86-9,货号:SI8630,纯度≥98%;头孢他啶,CAS:72558-82-8,货号:C9731,纯度≥98%;环丙沙星标准品,CAS:85721-33-1,货号:SC9020,纯度≥98%;阿米卡星,CAS:37517-28-5,货号:A9370,纯度≥98%,均购自北京 Solarbio 生物,纯度完全满足本研究需要。M-H 肉汤为美国 BD Difco,货号:BD212322,含量:99%,和 Oxiod 药敏纸片购自郑州万乔石医用技术有限公司,哥伦比亚血琼脂平板和 M-H 平板购自郑州安图生物。

1.3 方法 抑菌试验采用常量肉汤稀释法,联合药敏试验采用棋盘格稀释法,细菌耐药性逆转试验采用 K-B 纸片法,所有试验操作严格按照《全国临床检验操作规程(第 4 版)》进行。

1.3.1 药物的倍比稀释 称取小檗碱粉剂 1.280 g,加入 1 mL PBS 缓冲液中,配制成原液浓度为 1 280 mg/mL 的小檗碱溶液,4 ℃ 备用。准备小试管 12 支,向第 1 管加入 M-H 肉汤 1.8 mL,2~12 管 1.0 mL。使用定量移液器将第 1 管中的药物和肉充分混匀,吸取 1 mL 加入至第 2 管,以此类推,直至加至第 10 管后,将移液器的含药肉汤丢弃。第 11、12 管不做处理,作为生长对照和阴性对照。

1.3.2 菌悬液制备和加菌 CRPA 菌株室温复苏

后,转种至哥伦比亚血琼脂培养基,35 ℃,过夜培养。挑选单个菌落混悬于梅里埃配套上机专用稀释液(0.45% NaCl)中,调整浊度至 0.5 麦氏浓度(1.5×10^8 CFU/mL),使用营养肉汤稀释 30 倍,向二倍稀释好的药液的 1~11 支试管加 100 μL 菌悬液,最终接种量为 5×10^5 CFU/mL,第 12 管不加菌作为阴性对照。35 ℃ 孵育 18 h 观察结果,以能够抑制检测菌肉眼可见生长的最低药物浓度为检测菌对药物的最低抑菌浓度(MIC)。

1.3.3 小檗碱联合 5 种抗菌药敏性试验 联合药敏试验采用棋盘格常量稀释法小檗碱与抗菌药物的联合的联合作用,每种药物设 9 个稀释度,药物最高浓度为对应 MIC 的 4 倍,依次倍比稀释为 1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256 倍等 9 个浓度。联合的两种药物分别按纵列和横列加入 96 个无菌试管内,最终菌悬液浓度为 5×10^5 CFU/mL,35 ℃ 培养 18 h 后观察结果。根据两种药物联合前后的 MIC 计算联合药敏指数(FICI)判断联合药敏效果。FIC 计算公式为:FIC=MIC 甲药联合/甲药单用+MIC 乙药联合/MIC 乙药单用。判定标准:FICI≤0.5 为协同作用,0.5<FICI≤1 为相加作用,1<FICI≤2 为无关作用,FICI>2 为拮抗作用。

1.3.4 细菌耐药性逆转试验 以次 MIC 浓度小檗碱肉汤作为培养基质,挑取单个 CRPA 菌落于上述肉汤中,35 ℃ 孵育 18 h 后,使用上机专用稀释液(0.45% NaCl)离心洗涤,配制成 0.5 麦氏浊度菌悬液,在 M-H 平板上进行 K-B 法药敏试验,同时进行原菌株的药敏试验,比较逆转前后抑菌圈直径变化。

1.4 统计学处理 使用 SPSS19.0 软件进行统计分析。以 $\bar{x} \pm s$ 表示逆转前后抑菌圈直径,小檗碱逆转前后的抑菌圈直径比对采用配对 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRPA 对小檗碱敏感性 79 株 CRPA 对小檗碱显示出不同程度的敏感性,MIC 范围为 0.5~2.0 mg/mL,浓度为(1.67±0.55)mg/mL。

2.2 中西药联合 FICI 分布 79 株 CRPA 在联合用药后的 FICI 见表 1。

表 1 79 株 CRPA 联合用药 FICI 分布[n(%)]

药物组合	FICI			
	≤0.5	>0.5~1.0	>1.0~2.0	>2.0
哌拉西林+小檗碱	14(17.72)	40(50.63)	25(31.65)	0
头孢他啶+小檗碱	24(30.38)	43(54.43)	12(15.19)	0
亚胺培南+小檗碱	31(39.24)	45(56.96)	3(3.80)	0
环丙沙星+小檗碱	0	0	79(100.00)	0
阿米卡星+小檗碱	0	0	79(100.00)	0

2.3 小檗碱对 CRPA 细菌耐药性逆转结果 见表 2。

抗菌纸片	抑菌圈直径(mm)		<i>t</i>	<i>P</i>
	逆转前	逆转后		
哌拉西林	9.1±0.63	11.3±0.82	28.74	<0.01
哌拉西林/他唑巴坦	10.1±1.89	12.8±2.05	29.42	<0.01
头孢他啶	15.2±1.25	17.5±1.18	25.47	<0.01
头孢吡肟	19.1±0.86	19.1±0.79	1.13	0.39
亚胺培南	6.2±0.42	8.3±0.48	21.19	<0.01
美罗培南	8.0±0.61	10.3±0.58	25.52	<0.01
阿米卡星	15.1±0.23	14.9±0.31	0.35	0.75
环丙沙星	6.2±0.42	6.3±0.480	0.28	0.82
多黏菌素 B	21.5±1.77	21.7±2.04	0.47	0.59

3 讨 论

抗菌药物的问世给感染性疾病的治疗带来了福音,有效降低了各种细菌所造成感染性疾病的病死率。但随着广谱抗菌药物,尤其是碳青霉烯类药物在临床上的不合理使用甚至滥用,导致耐碳青霉烯类细菌的大量出现,CRPA 分离率在全球范围呈逐年上升趋势,给院内感染的治疗带来了巨大挑战,造成了沉重的经济负担和社会负担。中药用于感染性疾病的治疗由来已久,近年来的研究也表明,清热燥湿类中药具有抑菌、并通过各种途径延缓、消除细菌耐药性,恢复对抗菌药物的敏感性的功效。为发挥中药在抗菌治疗方面的优势,减少抗菌药物的毒副作用,本研究首先评估 CRPA 在小檗碱单用和与亚胺培南等 5 种药物联用的敏感性,进而利用小檗碱对受试菌株进行耐药性逆转试验,为 CRPA 的中西医结合治疗提供依据。本研究实验数据显示,79 株 CPRA 临床分离株对小檗碱的 MIC 范围为 0.5~2.0 mg/mL,浓度为 (1.67±0.55)mg/mL,与目前已有报道差异较大,低于房华、庄浩林和钟亮尹等人的研究,但高于石庆新等人的研究,这可能与选用的药物来源和菌株的耐药特性存在差异有关^[2-7]。但总体来看,无论是多重耐药铜绿假单胞菌还是 CRPA,对小檗碱 MIC 均在数百至数千微克级别,远高于西药的 MIC,这说明小檗碱的直接抑菌作用是比较弱的,可能与其在菌体内的蓄积浓度过低有关。从联合药敏试验结果来看,小檗碱与 β-内酰胺类抗菌药物哌拉西林、头孢他啶和亚胺培南存在不同程度的协同和相加作用,显著降低上述药物的 MIC,但与氨基糖甙类阿米卡星和喹诺酮类环丙沙星则显示出无相关作用,这可能与不同种类抗菌药物的作用机制存在关联。小檗碱的抑菌机制较为复

杂,有报道认为小檗碱能增加细菌细胞膜的通透性,抑制低亲和力青霉素结合蛋白的表达,抑制 AmpC 酶,抑制细菌 DNA 复制、RNA 转录,蛋白质翻译,拮抗肠毒素,抗黏附,干扰信息通路和调节免疫机能从而发挥综合性抗菌作用^[8-10]。此外,近期研究发现小檗碱可抑制 MexXY-OprM 型外排泵,增强大肠埃希菌对环丙沙星的敏感性和铜绿假单胞菌对氨基糖甙类和亚胺培南的敏感性,且效果要优于已知的外排泵抑制剂^[11-13]。虽然主动外排机制是导致铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的重要原因之一,但仍存在其他机制,如膜孔蛋白缺失,产碳青霉烯酶等,因此小檗碱单独或联合其他抗菌药物对抗 CRPA 的机制有待进一步的深入研究。

通过一定理化手段作用于耐药菌,使其恢复对抗菌药物的敏感性,从而逆转其耐药性是对抗多重耐药和泛耐药菌的重要手段之一。本研究发现,在使用小檗碱对 CRPA 进行耐药性逆转前后,CRPA 对部分抗菌药物如哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、亚胺培南和美罗培南耐药性有不同程度的减弱($P<0.05$),而对同属 β-内酰胺类抗菌药物的 4 代头孢菌素头孢吡肟、氨基糖甙类阿米卡星和喹诺酮类环丙沙星及多黏菌素 B 的耐药性无显著性变化($P>0.05$),这说明小檗碱对耐药性的逆转具有一定的药物选择性。研究表明,小檗碱能对铜绿假单胞菌的多种生物特性产生影响,如抑制细菌增殖,毒力因子产生,生物被膜形成及 6-脱氧-L-甘露糖产生及群体感应系统的调控^[14]。亦有研究认为,小檗碱可消除耐药 R 质粒从而逆转耐药性^[15]。由于本研究实验条件限制,未能对本次收集的 CRPA 进行耐药机制的详细解析,因此,无法确定小檗碱针对何种耐药机制发挥逆转作用。但小檗碱能在一定程度上逆转 CRPA 的耐药性是确定的,有关其确切的逆转机制有待进一步的深入研究。

参考文献

[1] KARAMPATAKIS T, ANTACHOPOULOS C, TSAKRIS A, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic area: comparison with global data[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(7): 1211-1220.

[2] 房华,汪瑞忠,张晓雪,等. 6 种中草药对多重耐药菌的抗菌活性及逆转耐药性作用的体外研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(4): 396-399.

[3] 房华,汪瑞忠,张晓雪,杨柳,汪海刚. 中西药联合对多重耐药铜绿假单胞菌体外抗菌作用研究[J]. *中国现代医生*, 2017, 55(31): 107-110.

[4] 房华,汪瑞忠,张晓雪. 中西药联合逆转多重耐药铜绿假单胞菌抗菌活性研究[J]. *医药前沿*, 2017, 7(29): 389-391.

(下转第 3057 页)

- [4] OHIRA T, SCHREINER P J, MORRISETT J D, et al. Lipoprotein(a) and incident ischemic stroke; the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study[J]. *Stroke*, 2006, 37(6):1407-1412.
- [5] DUBE J B, BOFFA M B, HEGELE R A. Lipoprotein(a): more interesting than ever after 50 years[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(2):133-140.
- [6] SPENCE J D, KOSCHINSKY M. Mechanisms of lipoprotein(a) pathogenicity[J]. *ATVB*, 2012, 32(7):1550.
- [7] EATON D L, FLESS G M, KOHR W J, et al. Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(10):3224-3228.
- [8] KRATZIN H, ARMSTRONG V W, NIEHAUS M, et al. Structural relationship of an apolipoprotein(a) phenotype (570 kDa) to plasminogen: homologous kringle domains are linked by carbohydrate-rich regions[J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1987, 368(2):1533-1544.
- [9] PATTHY L. Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules[J]. *Cell*, 1985, 41(3):657-663.
- [10] GEETHANJALI F S, LUTHRA K, LINGENHEL A, et al. Analysis of the apo(a) size polymorphism in Asian Indian populations; association with Lp(a) concentration and coronary heart disease[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 169(1):121-130.
- [11] HOLMER S R, HENGSTENBERG C, KRAFT H G, et al. Association of polymorphisms of the apolipoprotein(a) gene with lipoprotein(a) levels and myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2003, 107(5):696-701.
- [12] KAMSTRUP P R, TYBJAERG-HANSEN A, NORDE-STGAARD B G. Extreme lipoprotein(a) levels and improved cardiovascular risk prediction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(11):1146-1156.
- [13] ENKHMAA B, ANUURAD E, LIPOPROTEIN B L. (a): impact by ethnicity, environmental and medical conditions[J]. *J Lipid Res*, 2016, 81(16):R051904.
- [14] 中华放射学杂志心脏冠状动脉多排 CT 临床应用协作组. 心脏冠状动脉多排 CT 临床应用专家共识[J]. *中华放射学杂志*, 2011, 45(1):9-17.
- [15] KAMSTRUP P R, TYBJAERG-HANSEN A, STEFFENSEN R A. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction[J]. *JAMA*, 2009, 301(22):2331-2339.
- [16] 钱琦, 姜海, 郭守玉, 等. 血清脂蛋白(a)与冠心病的关系[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2016, 8(10):1201-1203.
- [17] ERQOU S, KAPTOGE S, PERRY P L, et al. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality[J]. *JAMA*, 2009, 302(4):412-423.
- [18] DUBE J B, BOFFA M B, HEGELE R A. Lipoprotein(a): more interesting than ever after 50 years[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(2):133-140.
- [19] HOPEWELL J C, SEEDORF U, FARRALL M, et al. Impact of lipoprotein(a) levels and apolipoprotein(a) isoform size on risk of coronary heart disease[J]. *J Intern Med*, 2014, 276(3):260-268.
- [20] CLARKE R, PEDEN J F, HOPEWELL J C, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(26):2518-2528.

(收稿日期:2018-06-24 修回日期:2018-09-12)

(上接第 3052 页)

- [5] 庄浩林, 何卓雄, 司徒瑞儒. 小檗碱对产 β -内酰胺酶的革兰阴性分离菌株的抑制作用研究[J]. *现代诊断与治疗*, 2015, 26(2):332-333.
- [6] 钟亮尹, 李瑞莹. 小檗碱对革兰阴性杆菌产 β -内酰胺酶分离菌株的抑菌作用[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(6):834-835.
- [7] 石庆新, 吕小萍, 於青峰, 等. 盐酸小檗碱和亚胺培南联合作用耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的体外药敏实验研究[J]. *中国现代医生*, 2017, 55(1):114-117.
- [8] 陈振辉, 司徒瑞儒, 林勇平, 等. 小檗碱对产 AmpC 酶细菌的抑菌作用探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(15):2049-2050.
- [9] 苏杞敏. 黄连素与环丙沙星联用对肺炎克雷伯菌的体外抑菌作用研究[D]. 广州医学院, 2013.
- [10] 籍艳秋. 黄连和大黄联合头孢他啶体内外抗菌作用[J]. *中国卫生标准管理*, 2015, 6(24):177-178.
- [11] 刘三侠. 小檗碱提取物抑制多重耐药大肠埃希菌外排喹诺酮类药物的研究[D]. 西南大学, 2013.
- [12] MORITA Y, NAKASHIMA K, NISHINO K, et al. Berberine is a novel type efflux inhibitor which attenuates the MexXY-Mediated aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:1223.
- [13] SU F, WANG J. Berberine inhibits the MexXY-OprM efflux pump to reverse imipenem resistance in a clinical carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate in a planktonic state[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15:467-472.
- [14] 王平, 夏飞, 贺立群, 等. 黄连提取物及小檗碱对铜绿假单胞菌密度感应系统的影响[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2015, 44(6):686-690.
- [15] 李延鸿, 朱怀军. 中药单方或复方对大肠埃希菌 R 质粒消除作用的研究[J]. *实用药物与临床*, 2013, 16(12):1147-1150.

(收稿日期:2018-05-11 修回日期:2018-07-30)