



杨诗雨,陈朝喜,梁军.黄藤素与 β -内酰胺抗生素及其抑制剂联用抗菌活性评价[J].中兽医学杂志,2025,60(2):48-56.
YANG S Y, CHEN C X, LIANG J. Synergistic antibacterial effect of fibriuretinin with β -lactams and their inhibitors[J]. Traditional Chinese veterinary medicine, 2025, 60(2): 48-56.

黄藤素与 β -内酰胺抗生素及其抑制剂 联用抗菌活性评价

杨诗雨¹, 陈朝喜¹, 梁 军^{2*}

(1. 西南民族大学 畜牧兽医学院, 四川 成都 610041; 2. 郑州市产品质量检验检测中心, 河南 郑州 450001)

摘要:【目的】黄藤素是从防己科植物天仙藤等药用植物中提取的季铵类生物碱, 主要包括巴马汀、小檗碱、黄连碱、药根碱等, 具有抗菌消炎、抗病毒、降血压等药理作用。旨在探讨黄藤素单用及其与 β -内酰胺抗生素联用对标准菌株和临床分离菌株的体外抗菌效果, 为拓展黄藤素在抗菌领域的临床应用价值以及开发新型抗菌增敏剂提供理论依据。【方法】采用微量肉汤稀释法测定黄藤素单用及其与 β -内酰胺抗生素联用对4种标准菌株(大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、枯草芽孢杆菌 ATCC6633、白色念珠菌 ATCC10231)和4种临床分离菌株(大肠杆菌 EAEC-SWUN-37、沙门氏菌 STM-HNAU-102、痢疾杆菌 SHI-SWUN-64 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA-HNAU-4213)的体外抗菌作用。【结果】(1)黄藤素单用对4株标准菌株有一定抗菌活性, 最小抑菌浓度(MIC)介于128~256 $\mu\text{g/mL}$; 但对4株临床分离株的抗菌活性均较弱, 其MIC均大于512 $\mu\text{g/mL}$ 。(2)64 $\mu\text{g/mL}$ 黄藤素能使临床分离菌对受试 β -内酰胺类抗生素的敏感性提高, 抑菌浓度指数(FICI)介于0.562 5~1.125 0。(3)128 $\mu\text{g/mL}$ 和256 $\mu\text{g/mL}$ 黄藤素均能显著提高临床分离菌对受试 β -内酰胺类抗生素的敏感性, FICI介于0.375 0~0.750 0。【结论】黄藤素单用抗菌活性有限, 但其与 β -内酰胺类抗生素联用后能够显著提高后者对临床分离菌的抗菌活性, 且增敏效应具有质量浓度依赖性, 显示出良好的联合用药潜力。

关键词:黄藤素; 生物碱; 最小抑菌浓度; 抑菌浓度指数; β -内酰胺类抗生素; 联合用药

中图分类号: S852.61 文献标志码: A 文章编号: 1003-8655(2025)02-048-09

Synergistic antibacterial effect of fibriuretinin with β -lactams and their inhibitors

YANG Shiyu¹, CHEN Chaoxi¹, LIANG Jun^{2*}

(1. College of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;
2. Zhengzhou Inspection and Testing Center of Product Quality, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: [Objective] Fibriuretinin is a quaternary ammonium alkaloid extracted from *Fibraurea recisa* Pierre. and other medicinal plants, mainly including palmatine, berberine, coptisine, jatrorrhizine, etc. It has various pharmacological effects, including antibacterial, anti-inflammatory, antiviral and antihypertensive

基金项目:四川省自然科学基金项目(2023NSFSC0179)和西南民族大学双一流项目(XM2023013)

Project supported by the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2023NSFSC0179) and Southwest Minzu University Double World-class Project (XM2023013).

作者简介:杨诗雨, 硕士生, orcid.org/0009-0005-6083-9910, y15082386631@163.com; *通信作者: 梁军, 副研究员, 博士, 主要从事兽药残留检测与细菌耐药性研究, orcid.org/0009-0006-6789-3159, liangjunhn@aliyun.com.

©《中兽医学杂志》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 协议

activities. This study aims to investigate the *in vitro* antibacterial effects of fibriuretinin alone and in combination with β -lactam antibiotics against standard strains and clinically isolated strains. It seeks to provide theoretical support for expanding the clinical application of fibriuretinin in the field of antibacterial therapy and for developing novel antibacterial sensitizers. [Method] In this study, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of fibriuretinin alone and in combination with β -lactam antibiotics against reference strains *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Candida albicans* ATCC10231 and clinical isolates of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were determined by the broth microdilution method. [Result] (1) Fibriuretinin alone had certain antibacterial activity against the four standard strains, with MICs ranging from 128 to 256 $\mu\text{g/mL}$. The antibacterial activity against the four clinical isolates was weak, with MICs all greater than 512 $\mu\text{g/mL}$. (2) At 64 $\mu\text{g/mL}$, fibriuretinin could partially increase the sensitivity of clinical isolates to the tested β -lactam antibiotics, with the fractional inhibitory concentration index (FICI) ranging from 0.562 5 to 1.125 0. (3) At 128 $\mu\text{g/mL}$ and 256 $\mu\text{g/mL}$, fibriuretinin could significantly increase the sensitivity of clinical isolates to the tested β -lactam antibiotics, with FICI ranging from 0.375 to 0.750. [Conclusion] In summary, while fibriuretinin exhibits limited antimicrobial activity when used alone, the antimicrobial activity was significantly enhanced against clinically isolated strains and the potentiation effect was concentration-dependent in combination with β -lactam antibiotics, indicating the promising potential for combined therapeutic applications.

Keywords: fibriuretinin; total alkaloids; minimal inhibitory concentrations; fractional inhibitory concentration index; β -lactam antibiotics; combination therapy

【研究意义】多重耐药菌感染的治疗是当今医疗界最难解决的问题之一。抗生素滥用是细菌产生耐药性的关键因素,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)在2007年《世界卫生报告》中明确指出,细菌耐药是威胁人类健康的重大公共卫生问题^[1-2]。中草药作为华夏文明的重要组成部分,其疗效确切,药理作用广泛,在感染性疾病治疗中发挥重要作用。然而,长期以来,其作用机理不清、药效物质不明限制了其发展。随着现代分离分析技术的发展,具有重要医疗价值的有效单体相继被分离鉴定,并逐渐成为抗菌治疗和逆转耐药性研究的热点^[3-4]。由于中草药不受细菌耐药机制的影响^[5-6],很少发生细菌耐药现象并能增强抗生素的抗菌作用^[7-8]。其主要通过消除耐药质粒^[9-10]、抑制 β -内酰胺酶^[10-11]、抑制耐药基因突变^[12-13]、抑制耐药菌外排泵^[14-16]、抑制细菌生物被膜形成^[17-19]等方式逆转细菌对抗生素耐药。因此,中草药与抗菌药物联合用药在抗菌、抗病毒方面彰显出独特的优势,在逆转耐药性方面具有广阔的发展空间和应用前景。【前人研究进展】黄藤素(fibriuretinin)是从防己科植物天仙藤(*Fibraurea recisa* Pierre.)等提取的季铵类生物碱,主要包括巴马汀(palmatine)、小檗碱(berberine)、黄连碱(coptisine)、药根碱(jatrorrhizine)等^[20-21]。黄藤素具有广泛的生物活性和药理作用,在临床上应用于治疗妇科炎症、菌痢、肠炎、呼吸道及尿路感染、外科感染、眼结膜炎等^[22-24]。王慧敏^[25]通过体外试验验证了黄藤化合物具有较好的抗菌活性;于浩飞等^[26]研究表明,黄藤素对二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀等具有明显的抗炎作用;伍幼如^[27]的临床研究证实,黄藤素注射液治疗慢性盆腔炎疗效显著。黄藤素在抗疟原虫^[28]、抗病毒^[29]、抗肿瘤^[30],以及降低血压、抑制结肠 Ca^{2+} 、 Cl^{-} 分泌^[31]等方面也有报道。上述研究从不同层面验证了黄藤素的核心药理作用,也为其在更多感染性与炎症性疾病中的深入应用奠定了理论基础。

【本研究切入点】尽管黄藤素的抗菌抗炎活性在医学领域已得到初步验证,但现有研究仍存在明显局限:一方面,多数研究集中于盐酸小檗碱等少数成分,对黄藤素整体及其主要生物碱的协同作用机制关注不足;另一方面,在兽医临床中,尤其是针对畜禽常见病原菌及其耐药菌株方面的药效与增敏潜力的相关研究尚属空白。此外,黄藤素能否逆转兽医临床中常见的 β -内酰胺类抗生素耐药,并恢复其对多重耐药菌的敏感性,仍有待系统阐明。【拟解决的关键问题】本研究拟以4种标准菌株(大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、枯草芽孢杆菌 ATCC6633、白色念珠菌 ATCC10231)与4种临

床分离菌株(大肠杆菌 EAEC-SWUN-37、沙门氏菌 STM-HNAU-102、痢疾杆菌 SHI-SWUN-64 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA-HNAU-4213)为试验对象,采用微量肉汤稀释法与棋盘法联合药敏试验,探究黄藤素单用及其与 β -内酰胺类抗生素联用的体外抗菌与增敏效应,为兽医临床合理使用黄藤素作为抗菌增敏剂、防控耐药菌感染提供理论基础和数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株和临床分离菌株

标准菌株(大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、枯草芽孢杆菌 ATCC6633、白色念珠菌 ATCC10231)由西南民族大学兽医药理学与毒理学实验室保存。大肠杆菌 EAEC-SWUN-37、沙门氏菌 STM-HNAU-102、痢疾杆菌 SHI-SWUN-64 和金黄色葡萄球菌 MRSA-HNAU-4213 临床分离株由河南农业大学和西南民族大学分离并鉴定为产 β -内酰胺酶多重耐药菌株(表 1), -70°C 保存备用。

表 1 供试临床菌株基本信息

Tab.1 Basic information of clinically isolated strains

菌种 Microorganism	编号 Strain number	来源 Origin	样本 Sample	耐药谱型 Drug resistance profile	毒力谱型 Virulence profile
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	EAEC-SWUN-37	藏鸡	粪便	AMP/DOX/FLR/LVF/OXA/OXY/POL/SMX/ SMZ/TCY	<i>astA/bcsA/fimC/fyuA/irp2/ ompT/sitA/tsh</i>
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	STM-HNAU-102	青脚麻鸡	肛拭子	DOX/GEN/FLR/LVF/OXY/POL/RIF/SMX/SMZ/ TCY	<i>avrA/cigR/misL/spiC/sptP/ sseL</i>
痢疾杆菌 <i>Shigella</i>	SHI-SWUN-64	藏鸡	粪便	AMP/DOX/FLR/LVF/OXA/OXY/POL/RIF/SMX/ SMZ/TCY	<i>alkA/citC/cysG/dam/yphF</i>
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA-HNAU-4213	青脚麻鸡	脓液	AMC/AMP/DOX/FOS/GEN/LVF/SMX/SMZ	<i>aur/hlgA/hlgB/PVL/sea/seb</i>

AMC:阿莫西林-克拉维酸;AMP:氨苄西林;DOX:多西环素;FLR:氟苯尼考;FOS:磷霉素;GEN:庆大霉素;LVF:左旋氧氟沙星;OXA:苯唑西林;OXY:土霉素;POL:多黏菌素;RIF:利福平;SMX:磺胺甲噁唑;SMZ:磺胺二甲嘧啶;TCY:四环素。

AMC: Amoxicillin-clavulanic acid; AMP: Ampicillin; DOX: Doxycycline; FLR: Florfenicol; FOS: Fosfomycin; GEN: Gentamicin; LVF: Levofloxacin; OXA: Oxacillin; OXY: Oxytetracycline; POL: Polymyxin; RIF: Rifampicin; SMX: Sulfamethoxazole; SMZ: Sulfamethazine; TCY: Tetracycline.

1.1.2 主要试剂与仪器

超净工作台(SW-CJ-1D,苏州净化设备有限公司);电热恒温培养箱(DNP-9272,上海申贤恒温设备厂);立式自动压力蒸汽灭菌器(G154DW,厦门致微仪器有限公司);超纯水机[ADVANTAGE A10,默克密理博默克生命科学技术(南通)有限公司];电子分析天平(XP205,梅特勒托利多科技(中国)有限公司);系列可调微量移液枪[艾本德(上海)国际贸易有限公司]; $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径灭菌过滤膜[默克密理博默克生命科学技术(南通)有限公司]。

1.1.3 主要试剂及药物

麦康凯琼脂培养基、SS(*Salmonella-Shigella*)培养基、MH(Mueller-Hinton broth)肉汤培养基、MH琼脂、Baird-Parker培养基等购自杭州天和微生物试剂有限公司;念珠菌显色培养基和改良马丁培养基(modified Martin medium,MMM)购自广东环凯微生物科技有限公司;阿莫西林(纯度 $>95\%$)、氨苄西林(纯度 $>95\%$)、头孢噻肟(纯度 $>99\%$)、头孢曲松(纯度 $>99\%$)购自上海金畔生物科技有限公司;阿莫西林钠克拉维酸钾购自L.E.K.医药化工有限公司;头孢噻唑(纯度 $>95.8\%$)购自辉瑞普强管理有限公司;头孢哌酮钠(纯度 $>98.0\%$)购自塞浦路斯麦道甘美大药厂; β -内酰胺酶抑制剂舒巴坦(纯度 $>98.0\%$)、巴马汀(纯度 $>98.0\%$)、小檗碱(纯度 $>98.0\%$)、黄连碱(纯度 $>98.0\%$)、药根碱(纯度 $>98.0\%$)等购自上海源叶生物科技有限公司;黄藤素原料药(纯度 $>97.0\%$)购自上海阳光试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基(液)和药物配制

各培养基(液)按说明书要求配制,经高压灭菌后备用。抗菌药物、黄藤素、巴马汀、小檗碱、黄连碱和药根碱参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)方法,配制成 2 560 μg/mL 母液,一次性滤膜过滤除菌后,于-20 ℃保存备用。

1.2.2 菌株复苏

取各菌株无菌接种于血琼脂平板,37 ℃培养 16~18 h 后,选取单个菌落接种于 10 mL 改良马丁培养液,37 ℃培养 16~18 h。复壮后,大肠杆菌接种于麦康凯琼脂平板,金黄色葡萄球菌接种于 Baird-Parker 琼脂平板,枯草芽孢杆菌接种于 MH 琼脂平板,白色念珠菌接种于念珠菌显色琼脂平板,沙门氏菌、痢疾杆菌接种于 SS 琼脂平板,37 ℃继续培养 16~18 h,观察菌落大小、颜色及形态。

1.2.3 MIC 和 FICI 测定

在 96 孔微量稀释板中,采用二倍稀释法对药液进行稀释,第 1 列药物质量浓度为 1 024 μg/mL。将复苏的菌液调整至 0.5 麦氏浊度(McFarland)后,并向除阴性对照外的所有孔中加入 100 μL 制备好的菌液,使每孔最终体积为 200 μL。37 ℃培养 12 h 后记录试验结果。参照 CLSI 推荐标准判定黄藤素单独使用或与 6 种β-内酰胺类抗生素及其β-内酰胺酶抑制剂联用时,对 4 株标准菌和 4 株临床分离菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentrations, MIC)。通过计算部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentrations index, FICI)判断黄藤素与 6 种临床常用β-内酰胺类抗生素联合作用效果。FICI 判断标准如下: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。

2 结果与分析

2.1 细菌培养菌落观察

3 株标准菌(大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、枯草芽孢杆菌 ATCC 6633)和 4 株临床分离菌株(大肠杆菌 EAEC-SWUN-37、沙门氏菌 STM-HNAU-102、痢疾杆菌 SHI-SWUN-64 和金黄色葡萄球菌 MRSA-HNAU-4213)在 MH 肉汤中均长势良好,白色念珠菌标准菌株 ATCC 10231 在改良马丁培养液中生长良好。其中,枯草芽孢杆菌在营养琼脂平板上呈现白色圆整、边缘光滑的菌落;白色念珠菌在念珠菌显色培养基上为蓝绿色小菌落;大肠杆菌在麦康凯培养基上呈现边缘整齐、圆形、扁平、表面光滑、湿润、鲜桃红色菌落;金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上呈现直径为 2~3 mm 的灰黑色菌落,边缘为淡色,周围有一混浊带,在其外层有一透明圈。沙门氏菌在 SS 培养基上呈现无色、半透明、圆形、边缘整齐、表面光滑湿润的菌落,菌落中心呈黑褐色。大肠杆菌在麦康凯琼脂培养基上呈现圆形、边缘整齐、光滑湿润的粉红色菌落。

2.2 药敏试验结果

2.2.1 黄藤素对标准菌及临床分离菌 MIC 的影响

黄藤素对 4 株标准菌和 4 株临床分离菌的 MIC 见表 2。试验结果显示,黄藤素单用对标准菌、临床分离菌均有一定抗菌活性。黄藤素对 4 株标准菌株的 MIC 介于 128~256 μg/mL,但对 4 株临床分离株的 MIC 均大于 512 μg/mL。

表 2 黄藤素对标准菌株和鸡源临床菌株最小抑菌浓度(MIC)的影响

Tab.2 The MIC of fibriuretinin against reference strains and clinical strains isolated from chickens

菌株 Strains	标准菌株 Reference strains				临床菌株 Clinical strains			
	大肠杆菌 ATCC25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC25922	金黄色葡萄球菌 ATCC25923 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	枯草芽孢杆菌 ATCC6633 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	白色念珠菌 ATCC10231 <i>Candida albicans</i> ATCC10231	大肠杆菌 EAEC- SWUN-37 <i>Escherichia coli</i> EAEC-SWUN-37	沙门氏菌 STM- HNAU-102 <i>Salmonella</i> STM-HNAU-102	痢疾杆菌 SHI-SWUN- 64 <i>Shigella</i> SHI- SWUN-64	金黄色葡萄球菌 MRSA-HNAU-4213 <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA-HNAU- 4213
最小抑菌 浓度/(μg·mL ⁻¹) MIC	128	128	128	256	1 024	512	512	1 024

2.2.2 黄藤素和β-内酰胺类抗生素及其抑制剂协同抗菌作用

从表3和表4可以看出,64 μg/mL的黄藤素能使临床分离菌对受试β-内酰胺类抗生素的敏感性部分提高,FICI介于0.562 5~1.125 0。128 μg/mL和256 μg/mL的黄藤素能使临床分离菌对受试β-内酰胺类抗生素的敏感性显著提高,FICI介于0.375 0~0.750 0。上述结果表明,64 μg/mL黄藤素与β-内酰胺类抗生素、β-内酰胺酶抑制剂联用对临床分离4株菌株均有协同或相加抗菌作用。128 μg/mL和256 μg/mL黄藤素与β-内酰胺类抗生素、β-内酰胺酶抑制剂联用对临床分离4株菌株均有协同抗菌作用。

表3 β-内酰胺类抗生素单用及其与不同质量浓度黄藤素协同对鸡源大肠杆菌EAEC-SWUN-37和沙门氏菌STM-HNAU-102的抗菌效果

Tab.3 Synergistic antibacterial effect of fibriuretinin with β-lactams and their inhibitors against <i>Escherichia coli</i> EAEC-SWUN-37 and <i>Salmonella</i> STM-HNAU-102 of clinically isolated from chickens																	
β-内酰胺类抗生素 β-lactams	大肠杆菌 EAEC-SWUN-37 <i>Escherichia coli</i> EAEC-SWUN-37								沙门氏菌 STM-HNAU-102 <i>Salmonella</i> STM-HNAU-102								大肠杆菌 ATCC25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC25922
	最小抑菌浓度/ (μg·mL ⁻¹) MIC				抑菌浓度指数 FICI				最小抑菌浓度/ (μg·mL ⁻¹) MIC				抑菌浓度指数 FICI				最小抑菌浓度/ (μg·mL ⁻¹) MIC
	A	B	C	D	B	C	D	A	B	C	D	B	C	D			
阿莫西林 Amoxicillin	256	128	128	64	0.562 5	0.625	0.500	128	64	32	16	0.625	0.5	0.625		2	
<i>m</i> (阿莫西林钠): <i>m</i> (克拉维酸)=5:1 <i>m</i> (Amoxicillin): <i>m</i> (Clavulanic acid)=5:1	32	16	8	4	0.562 5	0.375	0.375	32	16	8	4	0.625	0.5	0.625		2/0.4	
氨苄西林 Ampicillin	256	128	64	32	0.562 5	0.375	0.375	128	64	32	16	0.625	0.5	0.625		2	
<i>m</i> (氨苄西林): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1 <i>m</i> (Ampicillin): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1	64	32	16	8	0.562 5	0.375	0.375	32	16	8	4	0.625	0.5	0.625		2/1	
头孢噻肟 Cefotaxime	8	4	2	1	0.562 5	0.375	0.375	4	2	1	0.5	0.625	0.5	0.625		<0.125	
<i>m</i> (头孢噻肟): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1 <i>m</i> (Cefotaxime): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1	4	2	2	1	0.562 5	0.625	0.500	4	2	1	0.5	0.625	0.5	0.625		<0.125/0.063	
头孢噻呋 Ceftiofur	32	32	8	4	1.062 5	0.375	0.375	16	8	4	2	0.625	0.5	0.625		<0.125	
<i>m</i> (头孢噻呋): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1 <i>m</i> (Ceftiofur): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1	8	4	2	1	0.562 5	0.375	0.375	8	4	2	1	0.625	0.5	0.625		<0.125/0.063	
头孢曲松 Ceftriaxone	4	4	1	1	1.062 5	0.375	0.500	2	2	1	0.5	1.125	0.75	0.750		<0.125	
<i>m</i> (头孢曲松): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1 <i>m</i> (Ceftriaxone): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1	4	4	1	1	1.062 5	0.375	0.500	2	2	1	0.5	1.125	0.75	0.750		<0.125/0.063	
头孢哌酮 Cefoperazone	8	4	2	1	0.562 5	0.375	0.375	8	4	2	1	0.625	0.50	0.625		0.25	
<i>m</i> (头孢哌酮): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1 <i>m</i> (Cefoperazone): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1	4	4	2	1	1.062 5	0.625	0.500	4	4	2	1	1.125	0.75	0.750		0.125/0.063	

A: 不含黄藤素;B~D:黄藤素质量浓度分别为64 μg/mL、128 μg/mL、256 μg/mL。大肠杆菌ATCC25922为质控菌株。
A: Fibriuretinin not added; B~D: The concentrations of fibriuretinin were 64 μg/mL, 128 μg/mL and 256 μg/mL. ATCC25922 as reference strain.

表 4 β-内酰胺类抗生素单用及其与不同质量浓度黄藤素协同对鸡源痢疾杆菌 SHI-SWUN-64 和金黄色葡萄球菌 MRSA-HNAU-4213 的抗菌效果

Tab.4 Synergistic antibacterial effect of fibriuretinin with β-lactams and their inhibitors against *Shigella* SHI-SWUN-64 and *S. aureus* MRSA-HNAU-4213 clinically isolated from chickens

β-内酰胺类抗生素 β-lactams	痢疾杆菌 SHI-SWUN-64 <i>Shigella</i> SHI-SWUN-64								金黄色葡萄球菌 MRSA-HNAU-4213 <i>Staphylococcus.aureu</i> MRSA-HNAU-4213								大肠杆菌 ATCC25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC25922
	最小抑菌浓度/ (μg·mL ⁻¹) MIC								最小抑菌浓度/ (μg·mL ⁻¹) MIC								最小抑菌浓度/ (μg·mL ⁻¹) MIC
	抑菌浓度指数 FICI								抑菌浓度指数 FICI								
	A	B	C	D	B	C	D	A	B	C	D	B	C	D			
阿莫西林 Amoxicillin	128	64	32	16	0.625	0.50	0.625	256	128	64	32	0.562	5	0.375	0.375	2	
<i>m</i> (阿莫西林钠): <i>m</i> (克拉维酸)=5:1	16	16	4	1	1.125	0.50	0.562	5	32	32	16	4	1.062	5	0.625	0.375	2/0.4
<i>m</i> (Amoxicillin): <i>m</i> (Clavulanic acid)=5:1																	
氨苄西林 Ampicillin	128	64	32	16	0.625	0.50	0.625	256	128	64	32	0.562	5	0.375	0.375	2	
<i>m</i> (氨苄西林): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1	64	64	16	8	1.125	0.50	0.625	64	64	32	16	1.062	5	0.625	0.500	2/1	
<i>m</i> (Ampicillin): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1																	
头孢噻肟 Cefotaxime	8	4	2	1	0.625	0.50	0.625	16	8	8	2	0.562	5	0.625	0.375	<0.125	
<i>m</i> (头孢噻肟): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1	4	4	1	0.5	1.125	0.50	0.625	8	8	4	1	1.062	5	0.625	0.375	<0.125/0.063	
<i>m</i> (Cefotaxime): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1																	
头孢噻唑 Ceftiofur	16	8	4	2	0.625	0.50	0.625	32	16	16	4	0.562	5	0.625	0.375	<0.125	
<i>m</i> (头孢噻唑): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1	8	4	2	1	0.625	0.50	0.625	16	16	8	2	1.062	5	0.625	0.375	<0.125/0.063	
<i>m</i> (Ceftiofur): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1																	
头孢曲松 Ceftriaxone	4	4	2	0.5	1.125	0.75	0.625	8	8	4	2	1.062	5	0.625	0.500	<0.125	
<i>m</i> (头孢曲松): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1	2	2	1	0.5	1.125	0.75	0.750	4	2	1	1	0.562	5	0.375	0.500	<0.125/0.063	
<i>m</i> (Ceftriaxone): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1																	
头孢哌酮 Cefoperazone	8	4	2	1	0.625	0.50	0.625	16	8	4	2	0.562	5	0.375	0.375	0.25	
<i>m</i> (头孢哌酮): <i>m</i> (舒巴坦)=2:1	4	2	1	0.5	0.625	0.50	0.625	4	2	2	1	0.562	5	0.625	0.500	0.125/0.063	
<i>m</i> (Cefoperazone): <i>m</i> (Sulbactam)=2:1																	

A: 不含黄藤素; B~D: 黄藤素质量浓度分别为 64 μg/mL、128 μg/mL、256 μg/mL。大肠杆菌 ATCC25922 为质控菌株。
A: Fibriuretinin not added; B~D: The concentrations of fibriuretinin were 64 μg/mL, 128 μg/mL and 256 μg/mL. ATCC25922 as reference strain.

3 讨 论

近年来,抗菌药物的广泛与超量使用,引发了耐药菌种类增多、耐药水平增高、多重耐药现象加剧等问题。细菌耐药性问题已经成为亟待解决的全球性难题,其不仅导致临床治疗困难加剧,还对人类和动物的健康形成威胁。新抗菌药研发成本投入大、周期长,且临床有效使用周期越来越短,新药研发速度已远远不能满足临床治疗需求。目前,国内外科研工作者试图寻找耐药抑制剂,如克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦、利血平、氰氯苯腈(CCCP)、2,4-二硝基酚(DNP)等以缓解日益严重的耐药性问题。克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦作为β-内酰胺酶抑制剂,对产β-内酰胺酶的革兰氏阴性菌抑制效果良好,且已用于临床治疗。虽然利血平、CCCp、DNP对细菌耐药性均有一定的抑制作用,但其本身的毒性较大导致不能广泛用于临床治疗。因此,研发低毒、有效、能消除广泛耐药机制的抑制剂具有巨大的应用价值和良好前景。尽管中药体外试验抗菌活性较低,但多项研究表明中药在体内治疗感染、消炎、抗肿瘤、逆转(或抑制)细菌耐药性、增强机体免疫等方面显示了独特的优势^[32]。在细菌耐药性不断增加、新型抗菌药上市不力的

严峻形势下,更需要重新认识和思考抗感染的治疗方法。对中药抗感染药物的正确认识,不能仅依据其体外抑菌、杀菌来评价其在抗感染中的作用,而应以全新的观点认识中药抗感染的临床疗效,中药中可能含有具有耐药消除效果且无毒副作用的细菌耐药抑制剂。

黄藤素具有多重药理活性,能够增强白细胞吞噬能力,对多种革兰氏阳性菌和阴性菌有抑制作用,尤其具有抗真菌作用^[33]。作为季铵碱类阳离子抗菌药,黄藤素很容易被细菌多重耐药外排泵排出而降低菌体内药物浓度,对产生多重耐药外排泵菌株的抗菌能力较广谱抗菌药弱^[16]。本研究结果显示,黄藤素对 4 株临床产 β -内酰胺菌株的 MIC 均大于 256 $\mu\text{g/mL}$ 。这可能是 4 株临床菌不仅产生 β -内酰胺酶,还存在多重耐药外排泵的耐药机制。本试验还发现,128 $\mu\text{g/mL}$ 和 256 $\mu\text{g/mL}$ 黄藤素与 β -内酰胺抗生素联用对 4 株临床产 β -内酰胺菌株的 FICI 介于 0.375~0.75,即 128 $\mu\text{g/mL}$ 和 256 $\mu\text{g/mL}$ 黄藤素能使 β -内酰胺抗生素对临床产 β -内酰胺菌株的敏感性显著提高。以上结果表明黄藤素可作为抗菌药物增敏剂,显著恢复 β -内酰胺类抗菌药物对临床分离菌的抗菌效力。

罗芬芳^[34]研究发现单独使用黄藤素或联合头孢噻肟对于产 ESBLs 大肠埃希菌中的广谱酶 $bla_{\text{CTX-M-1G}}$ 、 $bla_{\text{CTX-M-9G}}$ 的 mRNA 表达水平并没有明显影响,表明黄藤素的抗菌增敏作用可能并不是通过影响 β -内酰胺酶 mRNA 的表达水平来实现的。而 Zhang 等^[35]研究发现盐酸巴马汀可作为 P-糖蛋白底物,抑制 P-糖蛋白对其他物质的转运作用,这可能是盐酸巴马汀抑制细菌多重耐药外排泵外排作用的机理。彭青^[36]研究黄芩素与 β -内酰胺类抗生素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的协同抗菌作用也发现,黄芩素对 MRSA 所产 β -内酰胺酶的活性也没有显著抑制作用,但黄芩素能抑制耐药泵的表达,使头孢唑啉在 MRSA 菌体内的蓄积浓度显著增加,并能诱导 MRSA 的自溶酶系统,使 MRSA 的自溶酶表达增加,或能使自溶酶水解细胞壁的活性增强。黄芩素也可能干扰了 DNA 的复制和修复,影响某些甲基化酶及核糖体蛋白的表达,从而阻碍了正常的蛋白质合成过程,增加了抗生素对 MRSA 的毒性作用。结合上述研究,本研究结果显示的黄藤素能使 β -内酰胺抗生素对临床产 β -内酰胺酶菌株的敏感性显著提高与多方面因素有关,其中黄藤素抑制细菌多重耐药外排泵外排作用可能是最重要的原因。因此,黄藤素与 β -内酰胺类抗生素联合方案,为应对日益严峻的细菌耐药性问题提供了一种极具开发潜力的候选策略。但本研究仅开展体外试验,缺乏体内感染模型验证,且所用耐药菌株范围有限,未来需构建动物模型评价其体内药效与安全性,并扩大菌株谱以综合评估其对各类耐药菌的增敏效果,重点深入探索其分子作用机制,为开发新型抗菌增敏剂提供坚实的理论基础。

4 结 论

本研究表明,黄藤素虽自身抗菌活性有限,但能作为高效的抗生素增敏剂,显著恢复 β -内酰胺类抗生素对临床分离菌的抗菌效力,其增敏效果呈现质量浓度依赖性,其中 128 $\mu\text{g/mL}$ 与 256 $\mu\text{g/mL}$ 的黄藤素协同作用较好,且将联合用药的 FICI 降至 0.75 以下。

参考文献 References:

- [1] FERRI M, RANUCCI E, ROMAGNOLI P, et al. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems [J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2017, 57(13): 2857-2876.
- [2] MURRAY C J L, IKUTA K S, SHARARA F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. The lancet, 2022, 399(10325): 629-655.
- [3] LIU B G, XIE M, DONG Y, et al. Antimicrobial mechanisms of traditional Chinese medicine and reversal of drug resistance: a narrative review [J]. European review for medical and pharmacological sciences, 2022, 26(15): 5553-5561.
- [4] ZHOU H J, WANG W L, CAI L, et al. Potentiation and mechanism of berberine as an antibiotic adjuvant against multidrug-resistant bacteria [J]. Infection and drug resistance, 2023, 16: 7313-7326.
- [5] RIVIÈRE C. Natural products as antimicrobial agents: from extraction to therapeutic applications [J]. Molecules, 2025, 30(11): 2393.
- [6] COX G, WRIGHT G D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions [J]. International journal of medical microbiology, 2013, 303(6/7): 287-292.

- [7] LANGEVELD W T, VELDHUIZEN E J, BURT S A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review[J]. Critical reviews in microbiology, 2014, 40(1): 76-94.
- [8] CHENG P, SUN Y Y, WANG B T, et al. Mechanism of synergistic action of colistin with resveratrol and baicalin against *mer-1*-positive *Escherichia coli*[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2024, 180: 117487.
- [9] 马驰. 不同中药对3种细菌耐药质粒的消除作用研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- MA C. Study on R-plasmid curing effect of different traditional Chinese medicine to three kinds of bacteria[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2011.
- [10] 吴峥嵘. 双黄连粉针剂对多重耐药大肠埃希菌耐药性影响的机理研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- WU Z R. Mechanism study of Shuanghuanglian powder injection on multidrug-resistant *Escherichia coli* resistance[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2013.
- [11] 刘琛楠, 刘忆霜, 肖春玲. 天然产物来源的金属 β -内酰胺酶抑制剂[J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(3): 305-310.
- LIU C N, LIU Y S, XIAO C L. Metallo- β -lactamase inhibitors from natural products[J]. Chinese medicinal biotechnology, 2020, 15(3): 305-310.
- [12] 江超, 胡杰, 李玉娟, 等. 天然化合物与抗菌药物联用应对细菌耐药性研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2025, 24(10): 1497-1503.
- JIANG C, HU J, LI Y J, et al. Research progress on the combination of natural compounds and antimicrobial agents to cope with antimicrobial resistance of bacteria[J]. Chinese journal of infection control, 2025, 24(10): 1497-1503.
- [13] 任玲玲, 鞠玉琳, 高威, 等. 中药复方制剂对大肠埃希菌多重耐药基因 *AcrA* 的影响[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(6): 1284-1286.
- REN L L, JU Y L, GAO W, et al. The influence of the Chinese traditional medicine on multidrug resistance gene *AcrA* of the *Escherichia coli*[J]. Hubei agricultural sciences, 2009, 48(6): 1284-1286.
- [14] LI Y, GE X Z. Role of berberine as a potential efflux pump inhibitor against MdrA from *Escherichia coli*: *in vitro* and *in silico* studies[J]. Microbiology spectrum, 2023, 11(2): e0332422.
- [15] RAMALINGAM S, CHANDRASEKAR M J N, KRISHNAN G G N, et al. Plant-based natural products as inhibitors for efflux pumps to reverse multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*: a mini review[J]. Mini-reviews in medicinal chemistry, 2024, 24(3): 272-288.
- [16] TONG Y J, ZHANG J Y, SUN N, et al. Berberine reverses multidrug resistance in *Candida albicans* by hijacking the drug efflux pump Mdr1p[J]. Science bulletin, 2021, 66(18): 1895-1905.
- [17] CHEN Y, LIU T J, WANG K, et al. Baicalein inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the quorum sensing system *in vitro*[J]. PLoS one, 2016, 11(4): e0153468.
- [18] ROHATGI A, GUPTA P. Natural and synthetic plant compounds as anti-biofilm agents against *Escherichia coli* O157: H7 biofilm[J]. Infection, genetics and evolution, 2021, 95: 105055.
- [19] NADAF N H, PARULEKAR R S, PATIL R S, et al. Biofilm inhibition mechanism from extract of *Hymenocallis littoralis* leaves[J]. Journal of ethnopharmacology, 2018, 222: 121-132.
- [20] 陈荣华, 傅胜才. 黄藤素的研制与应用文献综述[J]. 湖南畜牧兽医, 2014(6): 5-7.
- CHEN R H, FU S C. Literature review on the development and application of fibrauretin[J]. Hunan journal of animal science & veterinary medicine, 2014(6): 5-7.
- [21] 王书宁, 祝洪艳, 郜玉钢, 等. 黄藤总生物碱回流提取工艺的优化[J]. 中成药, 2018, 40(6): 1399-1403.
- WANG S N, ZHU H Y, GAO Y G, et al. Optimization of reflux extraction process for total alkaloids from *Fibraurea recisa* [J]. Chinese traditional patent medicine, 2018, 40(6): 1399-1403.
- [22] 吕娜, 赵昱玮, 汲立伟, 等. 黄藤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 199-202.
- LYU N, ZHAO Y W, JI L W, et al. Review of *Fibraurea recisa* [J]. Chinese journal of experimental traditional medical formulae, 2016, 22(19): 199-202.
- [23] 赵宜丰, 甘利平, 赵红月, 等. 黄藤素的生物学功能及其生产应用[J]. 饲料工业, 2023, 44(15): 12-18.
- ZHAO Y F, GAN L P, ZHAO H Y, et al. Biological function of palmatine and its application in animal production[J]. Feed industry, 2023, 44(15): 12-18.
- [24] LONG J Y, SONG J W, ZHONG L, et al. Palmatine: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics[J]. Biochimie, 2019, 162: 176-184.

- [25] 王慧敏. 黄藤化学成分体外抗深部真菌活性研究[D]. 昆明: 昆明医学院, 2008.
WANG H M. Study on antifungal activity of compounds from HuangTeng[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2008.
- [26] 于浩飞, 周敏, 吕小波, 等. 合成黄藤素与天然黄藤素药效对比实验研究[J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(9): 31-33.
YU H F, ZHOU M, LYU X B, et al. Comparative study of the efficacy of synthesized and natural palmatine[J]. Journal of Kunming medical university, 2012, 33(9): 31-33.
- [27] 伍幼如. 黄藤素注射液治疗慢性盆腔炎 102 例临床观察[J]. 中医药导报, 2007(6): 46.
WU Y R. Clinical observation on treating 102 cases of chronic pelvic inflammatory disease with fibrauretin injection[J]. Guiding journal of traditional Chinese medicine and pharmacy, 2007(6): 46.
- [28] WRIGHT C W, MARSHALL S J, RUSSELL P F, et al. *In vitro* antiplasmodial, antiamebic, and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids[J]. Journal of natural products, 2000, 63(12): 1638-1640.
- [29] ZHANG W, CHEN Y, YANG F, et al. Antiviral effect of palmatine against infectious bronchitis virus through regulation of NF- κ B/IRF7/JAK-STAT signalling pathway and apoptosis[J]. British poultry science, 2024, 65(2): 119-128.
- [30] SHINJI S, NAKAMURA S, NIHASHI Y, et al. Berberine and palmatine inhibit the growth of human rhabdomyosarcoma cells[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2020, 84(1): 63-75.
- [31] WU D Z, YUAN J Y, SHI H L, et al. Palmatine, a protoberberine alkaloid, inhibits both Ca^{2+} - and cAMP-activated Cl^- secretion in isolated rat distal colon[J]. British journal of pharmacology, 2008, 153(6): 1203-1213.
- [32] PAN M H, CHIOU Y S, TSAI M L, et al. Anti-inflammatory activity of traditional Chinese medicinal herbs[J]. Journal of traditional and complementary medicine, 2011, 1(1): 8-24.
- [33] 蔡瑾瑾. 口服抗菌消炎中成药与抗生素联用探讨[J]. 北方药学, 2013, 10(3): 195.
CAI J J. A Study on the combined use of oral antibacterial and anti-inflammatory Chinese patent medicines with antibiotics[J]. Journal of north pharmacy, 2013, 10(3): 195.
- [34] 罗芬芳. 黄藤素、没食子酸增加 β -内酰胺类抗生素对产 ESBLs 大肠埃希菌的敏感性及其作用机理初步探讨[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
LUO F F. Preliminary investigation of the mechanism for fibrauretin, gallic acid increasing susceptibility of ESBLs-producing *E. coli* to β -lactam antibiotics[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013.
- [35] ZHANG X F, QIU F R, JIANG J, et al. Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: involvement of P-glycoprotein[J]. Xenobiotica, 2011, 41(4): 290-296.
- [36] 彭青. 黄芩素与 β -内酰胺类抗生素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的协同抗菌作用研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2010.
PENG Q. Research on synergic effect of baicalein in combination with β lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[D]. Shantou: Shantou University, 2010.

(责任编辑: 刘俊峰)