

资料[10]显示,不同的肿瘤细胞对药物的敏感性存在很大的差异,这种差异直接影响试验的结果,所以选择敏感瘤株进行药敏试验显得至关重要。本实验根据文献资料分别选用 HQ-8910、K-562、Hct-8、SCG-7901 细胞进行了试验用瘤株筛选试验,通过试验最终选择最为敏感的 HQ-8910 为试验用瘤株,对康艾注、OMT 和 MT 进行抑制肿瘤细胞增殖作用的研究,结果发现康艾和苦参素体外的抑瘤作用无显著性差别,由此我们推测 OMT 可能为康艾注射液在体外发挥直接抑瘤作用的主要物质。同时实验显示 OMT 的体内主要代谢物为 MT,且有较原形物质更强的直接抑制肿瘤细胞增殖的活性,与资料报道一致^[11-12]。

康艾注射液和单方苦参素组含药血清的抑瘤率均呈随时间延长而下降的趋势,与血药浓度的下降趋势基本一致,由此我们推测,OMT 可能为康艾注射液中直接抑瘤作用的主要成分。血清药理学试验结果与体外药敏试验结果进行比较,我们发现含药血清对卵巢癌细胞 HQ-8910 的抑制作用显著大与相应浓度的药物溶液的作用,提示康艾注射液在体内代谢转化过程可能显著增强了其抑制肿瘤细胞增殖的效应,由此我们推测 OMT 为康艾注射液的主要直接抑瘤成分,且体内代谢转化过程显著增强了其作用。

参考文献:

[1] 王星,王三虎,郭华. 中药复方的抗癌研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(6): 74-73.
 [2] 李庆,范晓磊. 中药抗肿瘤研究进展[J]. 中国微生物学杂志.

2007, 19(3): 317.
 [3] X Wang, W Zhang, LY Fan. Sensitive quantitative determination of oxymatrine and matrine in rat plasma by capillary electrophoresis with stacking induced by moving reaction boundary [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 594: 290-296.
 [4] Song MQ, Zhu JS, Chen JL, et al. Synergistic effect of oxymatrine and angiogenesis inhibitor NM-3 on modulating apoptosis in human gastric cancer cells [J]. World Gastroenterol, 2007, 13(12): 1788-1793.
 [5] Zou J, Zhi HR, Xu Q, et al. Experimental study of the killing effects of oxymatrine on human colon cancer cell line SW1116 [J]. Chin J Digest Dis, 2005, 6: 15-20.
 [6] 赵军艳, 郑艳敏, 赵红艳, 等. 苦参碱和氧化苦参碱对肝癌细胞增殖凋亡及 JAK-STAT 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(4): 18-20.
 [7] 胡劲, 杨乐, 何雪心, 等. 氧化苦参碱对喉癌细胞株 Hep-2 抑制增殖及诱导凋亡实验研究[J]. 山东医药, 2007, 47(32): 24-23.
 [8] Liu T, Song Y, Chen H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(10): 1740-1745.
 [9] 王睿. 中药血清药理学研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院报, 2006, 18: 2243-2244.
 [10] 王秀坤, 李家实, 魏璐雪. 白刺花生物碱的体外抑瘤作用[J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(2): 59-61.
 [11] Li X, Yu C, Cai Y, et al. Simultaneous determination of six phenolic constituents of danshen in human serum using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 820(1): 44-47.
 [12] Wu XL, Hang TJ, Sen JP, et al. Determination and pharmacokinetic study of oxymatrine and its metabolite matrine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Pharm Biomed Anal, 2006, 41(3): 918-924.

[收稿日期] 2010-12-20

双黄连联合左氧氟沙星对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体外抗菌活性

杨嘉永¹, 徐和平², 孙洲亮¹ (厦门大学附属第一医院, 1. 药学部, 2. 检验部, 福建 厦门 361003)

[摘要] 目的: 评价双黄连与左氧氟沙星联合应用耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的体外抗菌作用。方法: 采用棋盘法设计, 微量肉汤稀释法测定其 MIC 值, 计算 FIC 指数。结果: 左氧氟沙星与双黄连联合应用后, 左氧氟沙星对 MRSA 的 MIC 值均有下降。同样, 双黄连对 MRSA 的 MIC 值亦有下降。FIC 指数范围主要在 0~1。结论: 左氧氟沙星与双黄连联合应用, 对 MRSA 的体外联合抗菌作用主以相加为主。

[关键词] 左氧氟沙星; 双黄连; 耐甲氧西林金葡菌; 联合用药

[中图分类号] R285.6 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5213(2011)14-1190-03

Study on the antibacterial activity of levofloxacin combined with Shuanghuanglian against MRSA

YANG Jia-yong¹, XU He-ping², SUN Zhou-liang¹ (The First Affiliated Hospital of Xiamen University, 1. Department of Pharmacy; 2. Department of Clinical Laboratory, Fujian Xiamen 361003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the antibiotic effects of levofloxacin combined with Shuanghuanglian against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in vitro.

[作者简介] 杨嘉永, 男, 学士, 副主任药师, 电话: 0592-2137395, E-mail: yjy_158@163.com

resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **METHODS** The protocol was designed by checkerboard method and the MICs of levofloxacin alone or combined with Shuanghuanglian against MRSA were determined by broth dilution method. The FIC index was calculated according to MIC results. **RESULTS** When levofloxacin combined with Shuanghuanglian, the MIC of levofloxacin against MRSA was reduced significantly. The MIC of Shuanghuanglian against the test bacteria was reduced significantly also. The range of the FIC index was mainly between 0~ 1. **CONCLUSION** The results suggested that additive effect of the anti-bacterial activity of levofloxacin combined with Shuanghuanglian against MRSA was the main action in this study.

KEY WORDS: levofloxacin; Shuanghuanglian; MRSA; drug combination

随着抗菌药物的广泛使用, 耐药细菌不断出现。其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA) 感染、HRV、AIDS 并列世界范围内三大最难解决的感染性疾病^[1]。目前, MRSA 对多种抗生素耐药, 致病力强且治疗效果差, 为引起医院感染的主要病原菌之一, 临床治疗相当棘手。联合用药则成为治疗此类复杂感染的有效途径。为了探索临床治疗 MRSA 感染的新途径, 发挥我国中医中药在抗感染方面的优势, 保护好目前少数对 MRSA 敏感的抗菌药物, 本文拟研究双黄连与左氧氟沙星联合应用体外抵抗 MRSA 效应, 以期临床中西药联合用药治疗 MRSA 感染提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 比浊仪(法国梅里埃 VITEK); 连续微量加样器(芬兰加样器); 96 孔平板(国产); AB104-N 电子天平(Mettler-toledo 公司)。

1.2 菌株 30 株临床分离致病菌, 经 VITEK-2 COMPACT 重新鉴定, 同时亦经头孢西丁纸片法实验(CLSI2010 版标准) 确认为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。质控菌为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC43300。

1.3 培养基 Muller-Hinton(MH) 肉汤和 Muller-Hinton(MH) 琼脂(杭州天和微生物试剂有限公司)。

1.4 抗菌药物 左氧氟沙星(中国食品药品检定研究院, 批号 130455-200604); 注射用双黄连(冻干, 规格 600 mg, 哈药集团中药二厂, 批号 0811004)。

2 方法

2.1 菌悬液配制 从已分纯并过夜新鲜培养的细菌平板上挑取 4~ 5 个菌落, 接种于 MH 肉汤中增菌 6 h。菌液用 3 mL MH 肉汤以比浊仪校正浊度到 0.5 McFarland, 再用 MH 肉汤稀释至 1.5×10^5 cfu·mL⁻¹。

2.2 抗菌药物储备液配制 左氧氟沙星用 pH 7.0 磷酸缓冲液配制成最终浓度 256 mg·L⁻¹ 的储备液, 双黄连用 0.9% 氯化钠配制成最终浓度 64 g·L⁻¹ 的储备液。

2.3 微量肉汤稀释法^[2] 将左氧氟沙星以灭菌 MH 肉汤倍比稀释成 11 个浓度, 分别为 64, 32,

.....0.063 mg·L⁻¹, 双黄连以灭菌 MH 肉汤倍比稀释成 11 个浓度, 分别为 64, 32,0.063 g·L⁻¹。将配制好的不同浓度的两种药物按棋盘法设计, 两两组合加入 96 孔平板中, 每种抗菌药物取 50 μL, 再将 1.5×10^5 cfu·mL⁻¹ 菌液 100 μL 加入孔中, 37 °C 过夜培养。观察结果, 记录单独应用两药的最低抑菌浓度 MIC_{甲药单用} 和 MIC_{乙药单用}, 并选择最佳组合效应时两药联合时各自的 MIC_{甲药联用} 和 MIC_{乙药联用}, 以计算 FIC 指数。

2.4 FIC 指数计算与判读标准^[3] FIC 指数 ≤ 0.5, 协同作用; 1 ≥ FIC 指数 > 0.5, 相加作用; 2 ≥ FIC 指数 > 1, 无关作用; FIC 指数 > 2, 拮抗作用。

$$FIC \text{ 指数} = MIC_{\text{甲药联用}} / MIC_{\text{甲药单用}} + MIC_{\text{乙药联用}} / MIC_{\text{乙药单用}}$$

3 结果

3.1 左氧氟沙星与双黄连联合应用对 MRSA 的 MIC 范围 由表 1 可见, 左氧氟沙星与双黄连联用后, 能明显降低该两类药物对 MRSA 的 MIC 值。

表 1 左氧氟沙星、双黄连单用与联用对 MRSA 的 MIC 范围 (n= 30)

Tab 1 The range of MIC of levofloxacin, Shuanghuanglian used alone and in combination drugs against 30 strains of MRSA (n= 30)

组合药物	单用	联用
左氧氟沙星/mg·L ⁻¹	0.5~ 16	0.125~ 8
双黄连/g·L ⁻¹	2~ 32	0.5~ 16

3.2 左氧氟沙星与双黄连联用对 MRSA 的 FIC 指数分成构成比的影响 由图 1 可见, 左氧氟沙星与双黄连联用后, 抗菌效果以相加效应为主, 协同效应和无关作用较少, 未见拮抗作用。

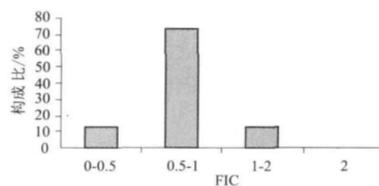


图 1 左氧氟沙星与双黄连联合应用对 MRSA 的 FIC 指数分布 (n= 30)

Fig 1 Fractional inhibitory concentration index (FIC) of levofloxacin combined with Shuanghuanglian in MRSA (n= 30)

3.3 左氧氟沙星与双黄连两药单用与联用对 MRSA 的浓度-累积抑菌百分率曲线 由图 2, 3 可见, 左氧氟沙星与双黄连联用后, 能使该两类药物对 MRSA 的浓度-累积抑菌百分率曲线明显左移, 体外抗菌效应增强。

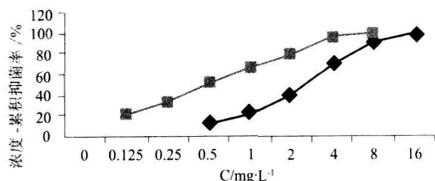


图 2 左氧氟沙星单用与联用双黄连时的 MRSA 浓度-累积抑菌百分率曲线 (n = 30)

—◆—左氧氟沙星单用; —■—左氧氟沙星联用

Fig 2 The cumulative inhibitory ratio (CIR) curves of levofloxacin and/or Shuanghuanglian in against MRSA (n = 30)

—◆—levofloxacin alone; —■—levofloxacin combination

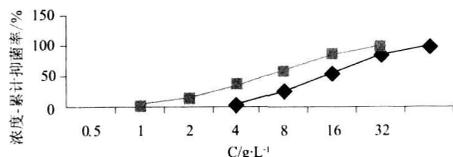


图 3 双黄连单用与联用左氧氟沙星时的 MRSA 浓度-累积抑菌百分率曲线 (n = 30)

—◆—双黄连单用; —■—双黄连联用

Fig 3 The cumulative inhibitory ratio (CIR) curves of Shuanghuanglian and/or Levofloxacin in against MRSA (n = 30)

—◆—Shuanghuanglian alone; —■—Shuanghuanglian combination

3.4 左氧氟沙星单用与联用对 MRSA 的敏感率 根据 CLSI (2010 版) 判读标准^[4], 在此 30 例临床分离 MRSA 菌株中, 左氧氟沙星单用时敏感菌株 6 例, 占 20%; 中介菌株 6 例, 占 20%; 耐药菌株 18 例, 占 60%。左氧氟沙星与双黄连联用后, 对左氧氟沙星敏感菌株 20 例, 占 66.67%; 中介菌株 3 例, 占 10%; 耐药菌株 7 例, 占 23.33%。体外实验表明, 18 例 MRSA 对左氧氟沙星单用时耐药菌株中有 9 例在左氧氟沙星与双黄连联用后转为对左氧氟沙星敏感, 2 例转为中介; 6 例 MRSA 对左氧氟沙星单用时中介菌株则在两药联用后 5 例转为对左氧氟沙星敏感, 因此, 左氧氟沙星联用双黄连后明显提高 MRSA 对左氧氟沙星敏感率, 具有显著性差异 (P < 0.01)。

4 讨论

随着抗菌药物的广泛应用, 细菌的耐药性也日益增加, 尤其是 MRSA 感染的发生率呈逐年上升趋势, 在我国, 每年有 5% ~ 10% 的患者发生 MRSA 院内感染^[5]。MRSA 是医院内感染的主要病原菌, 具有多重耐药特征, 几乎对所有 β-内酰胺类抗菌药物耐药, 并累及到大环内酯类、喹诺酮类和氨基糖苷类等抗菌药物。该菌严重的耐药现象, 已成为临床

难治感染之一。

本实验中左氧氟沙星与双黄连联合应用于体外抗 MRSA, 可显著降低两药单独应用时的用药剂量。单用左氧氟沙星, 对 30 株临床分离 MRSA 菌的 MIC₉₀ 为 8 mg·L⁻¹, 而联合应用双黄连后 MIC₉₀ 低于 4 mg·L⁻¹; 单用双黄连, 对 30 株临床分离 MRSA 的 MIC₉₀ 约为 32 g·L⁻¹; 而联合应用左氧氟沙星后 MIC₉₀ 约为 16 g·L⁻¹, 提示两者有较明显的协同/相加作用。实验中我院临床分离出的 30 株 MRSA 菌对左氧氟沙星耐药率高达 60% 以上, 通过左氧氟沙星与双黄连联合应用后, 则此 30 株 MRSA 菌对左氧氟沙星耐药率只有 23.33%, 下降了 36.67%, 说明两药联合应用能提高左氧氟沙星对 MRAS 的敏感性。由图 2、图 3 可知, 左氧氟沙星和双黄连联合应用于体外抗 MRSA 与两药单用比较, 累积抑菌百分率曲线显著左移, 表明此两药抗菌作用相互增强。由图 1 可知, FIC 分布多数集中于 0.5 ~ 1 之间, 表明两药联合应用抗 MRSA 主要表现为相加作用, 相加作用、协同作用及无关作用构成比分别为 73%、8% 和 8%, 无拮抗作用。

从本实验结果可以看出, 两药联用对我院临床分离的 30 株 MRSA 体外抗菌效应明显增强, 但由于 MRSA 感染为临床难治感染, 患者病情普遍较严重, 临床一旦确诊医生一般首先考虑应用目前对 MRSA 最有效的糖肽类药物, 较少或基本不会考虑应用中成药/中草药治疗, 故中西药联合应用在临床抗感染中尤其是抗 MRSA 等较复杂感染中的相关益处仍有待进一步研究。可喜的是, 史载祥教授成功运用中药治疗 1 例由 MRSA 感染引起的顽固发热^[6], 显示了中成药/中药在临床应用治疗 MRSA 感染时仍具有一定优势。

参考文献:

- [1] 马翔宇, 易龙, 宋治远. 医源性 MRSA 感染及其防治研究进展 [J]. 临床医学, 2003, 23(5): 53-54.
- [2] Sahm DF, Washington II JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution methods [J]. Manual Clin Microbiol, 1995, 6: 1117.
- [3] George M, Eliopoulos, Robert C, et al. Antimicrobial Combinations [A]. Antibiotics in Laboratory Medicine [M]. 4th ed. 1996: 330.
- [4] Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement [S]. CLSI, 2010: M100-S20.
- [5] 吕星, 郭文学, 王淑香, 等. 天津市某医院 2002~2003 年临床分离金黄色葡萄球菌耐药谱及 MRSA 流行趋势 [J]. 中国感染控制杂志, 2006, 5(2): 172-173.
- [6] 李格, 贾海忠. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染引起的顽固发热病案 [J]. 中医杂志, 2006, 56(11): 850.

[收稿日期] 2011-02-24