

联合用药体外抗幽门螺杆菌相互影响的实验研究

章杰兵, 古卓良, 周国华(南京军区药品仪器检验所, 南京 210002)

摘要:目的 观察阿莫西林(A)、甲硝唑(M)和胶体次枸橼酸铋(B)单独和联合使用时体外抗幽门螺杆菌效果及相互影响作用,为临床治疗幽门螺杆菌感染的合理用药和新药研究提供参考。方法 采用二倍稀释法和棋盘格法,通过测定最低抑菌浓度(MIC),计算出联合抑菌分数(FIC),作为抗菌效果评价指标,测定三种药物及联合使用时的抗菌效果。结果 MIC_A 为 $0.078 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, MIC_M 为 $31.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, MIC_B 为 $62.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。A与M联用FIC指数为0.75,有协同作用;A与B联用、M与B联用FIC指数均等于1,无协同作用。A、M与B三药联合使用FIC指数为0.75,有一定的协同作用。结论 A与M联合使用有一定的协同抗菌作用,A、M与B联合使用亦有一定的协同抗菌作用,但主要的抗菌效果是来自A的作用。

作者简介:章杰兵,男,副主任药师 Tel:(025)84540665 E-mail:Jbz2007@yahoo.com.cn

关键词:幽门螺杆菌;阿莫西林;甲硝唑;胶体次枸橼酸铋

中图分类号:R915.11

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2007)05-0418-04

Study on Interaction of Combined Medication to *Helicobacter Pylori* in Vitro

ZHANG Jie-bing, GU Zhuo-liang, ZHOU Guo-hua(Institute of Drug and Instrument, Nanjing Military Area, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the effects of amoxicillin(A), metronidazole(M) and colloidal bismuth subcitrate(B) alone or in combination on anti-*Helicobacter Pylori*(HP) in vitro, giving some advice on rational medicine use and new drug research on clinical therapy of *Helicobacter Pylori* infection. **METHODS** Using the method of agar dilution test and Checkboard test, MIC and FIC were measured, which were used to evaluate anti-bacteria effect and their interaction. **RESULTS** The MIC of amoxicillin, metronidazole and colloidal bismuth subcitrate was 0.078, 31.2 and 62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. The FIC of amoxicillin and metronidazole was 0.75, which showed synergism; the FIC of amoxicillin and colloidal bismuth subcitrate, metronidazole and colloidal bismuth subcitrate was 1, which didn't show synergism. The FIC of amoxicillin, metronidazole and colloidal bismuth subcitrate was 0.75, showing synergism. **CONCLUSION** The Combined medication of amoxicillin and metronidazole or metronidazole and colloidal bismuth subcitrate showed synergism of anti-bacteria on certain condition, the main anti-bacteria medicine was amoxicillin.

KEY WORDS: *Helicobacter Pylori*; amoxicillin; metronidazole; colloidal bismuth subcitrate

幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, HP)感染是慢性胃炎及消化性溃疡重要致病因素,HP通过损害胃黏膜屏障并释放毒素和炎性介质,形成胃及十二指肠的一系列病理改变^[1]。目前临床针对HP感染的一线治疗仍沿用十多年前形成的治疗方案,即以2种抗菌药与1种铋剂或1种质子泵抑制剂为基础的三联、三联疗法^[2],然而多年来的临床实践效果仍不能令人满意^[3]。笔者采用体外抗幽门螺杆菌实验,通过测定阿莫西林、甲硝唑、胶体次枸橼酸铋及相互间联合使用时的最低抑菌浓度(MIC),探讨联合用药治疗HP感染时药物间的相互影响,为临床治疗HP感染选择治疗药物,拟定合理的治疗方案及新药物制剂的研究提供参考。

1 材料

1.1 药品及试剂

阿莫西林(A):广州制药厂生产,批号031012;甲硝唑(M):青岛制药厂生产,批号040322;胶体次枸橼酸铋(B):金华第三制药厂,批号030623;布氏血清肉汤培养液、无菌蒸馏水:自制。

1.2 菌株

幽门螺杆菌:由HP阳性慢性胃炎患者胃黏膜活检组织块中分离培养,经生化鉴定证实为幽门螺杆菌,用比浊法测定并调整菌液浓度约为 $5 \times 10^6/\text{mL}$,供抑菌试验用。

2 方法

2.1 阿莫西林、甲硝唑、胶体次枸橼酸铋三种药物单独使用体外抗HP的最低抑菌浓度的测定

取阿莫西林原料适量,精密称量,加无菌蒸馏水使溶解,制成每1 mL含100 μg 的溶液。照二倍稀释法^[4],吸取该溶液0.10 mL,加至含1.90 mL布氏血清肉汤培养液试管中,振荡混匀,即为5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,然后再从中吸取1.0 mL,加至含1 mL布氏血清肉汤培养液试管中,即为2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

溶液,余类推,制成系列浓度:5.0,2.5,1.25,0.625,0.313,0.156,0.078,0.039,0.020,0.010 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,另设一管不含药的空白对照管。在上述每管中加入已活化培养的幽门螺杆菌菌液0.1 mL,混匀后37℃微氧环境培养72 h,观察各管有无细菌生长,以无菌生长的最高药物稀释度作为最低抑菌浓度。

甲硝唑和胶体次枸橼酸铋按上述同样方法,配制成系列梯度浓度,依法测定各自的最低抑菌浓度。甲硝唑浓度分别为:500,250,125,62.5,31.9,15.6,7.8,3.9,2.0,1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。胶体次枸橼酸铋浓度分别为:500,250,125,62.5,31.2,15.6,7.8,3.9,2.0,1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 阿莫西林、甲硝唑、胶体次枸橼酸铋互相组合体外抗HP的效果测定

2.2.1 阿莫西林与甲硝唑联合按照“棋盘格法”进行实验操作^[4]。两种药物梯度浓度的配制照前述方法准备,浓度分别为:

A:0.078,0.039,0.020,0.010,0.005,0.0025 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

M:31.2,15.6,7.8,3.9,2.0,1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

用 $\text{MIC}_A(\text{M})$ 表示与M联合作用时,A的最小抑菌浓度。

用 $\text{MIC}_M(\text{A})$ 表示与A联合作用时,M的最小抑菌浓度。

两药联合抗菌效果用FIC指数(联合抑菌分数)来评价。

$\text{FIC指数} = \text{FIC}(\text{A}) + \text{FIC}(\text{M})$

其中: $\text{FIC}(\text{A}) = \text{MIC}_A(\text{M}) / \text{MIC}_A(\text{A单独试验时的MIC})$

$\text{FIC}(\text{M}) = \text{MIC}_M(\text{A}) / \text{MIC}_M(\text{M单独试验时的MIC})$

当FIC指数 <1 时,表示A和M在适当的浓度时有协同作用;FIC=1时,表示有累加作用;当FIC >1 时,表示有拮抗作用。

2.2.2 阿莫西林与胶体次枸橼酸铋联合使用

方法同上,两种药物的各梯度浓度为:

A:0.078,0.039,0.020,0.010,0.005,0.0025 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
B:62.5,31.2,15.6,7.8,3.9,2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.2.3 甲硝唑与胶体次枸橼酸铋联合使用 方法同上,两种药物的梯度溶液分别为:

M:31.2,15.6,7.8,3.9,2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
B:62.5,31.2,15.6,7.8,3.9,2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.3 阿莫西林、甲硝唑、胶体次枸橼酸铋联合使用体外抗菌效果测定

实验方法同上述二种药物联合测定相同。三种组分各取四个梯度浓度:

A:0.078,0.039,0.020,0.010 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
M:31.2,15.6,7.8,3.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

以上每组分的各梯度浓度分别与另二种组分的各梯度浓度混合,然后进行抗菌测定。

三种药物联合抗菌效果也用 FIC 指数来评价。

FIC 指数 = FIC(A) + FIC(B)[或者 FIC(M)]

当 FIC 指数 < 1.0,表示三种药物在适当的浓度时有协同的抗菌作用;当 FIC 指数 = 1 时,只有累加作用;而 FIC 指数 > 1.0,则有拮抗作用。

3 结果

阿莫西林、甲硝唑和胶体次枸橼酸铋的最低抑菌浓度见表 1,可见阿莫西林抗菌作用强,而甲硝唑和胶体次枸橼酸铋的抗菌作用较弱。

表 1 阿莫西林、甲硝唑、胶体次枸橼酸铋的最低抑菌浓度($n=2$)

Tab 1 The MIC of amoxicillin, metronidazole and colloidal bismuth subcitrate

药物	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$									MIC/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
阿莫西林(A)	0.01	0.02	0.039	0.078	0.156	0.312	0.625	1.25	2.50	0.078
(生长状况)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
甲硝唑(M)	1.0	2.0	3.9	7.8	15.6	31.5	62.5	125	250	31.5
(生长状况)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
胶体枸橼酸铋(B)	1.0	2.0	3.9	7.8	15.6	31.5	62.5	125	250	62.5
(生长状况)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

Note:“+”Represent positive,“-” Represent negative

每两种药物联合使用抗菌试验结果见表 2,结果表明阿莫西林和甲硝唑有协同作用,而阿莫西林和胶体次枸橼酸铋,以及甲硝唑和胶体次枸橼酸铋只表现出累加的抗菌作用,而无协同作用。

三种药物联合抗菌试验结果见表 3,FIC 指数为 0.75,表明三种药物联用有一定的协同作用。

表 2 二种药物联合抗菌作用试验结果($n=2$)

Tab 2 The anti-bacteria effect of two medicine in combination

药物	MIC/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	FIC _X	FIC _Y	FIC
A + M	MIC _A (M)=0.039, MIC _M (A)=7.8	$\frac{\text{MIC}_A(M)}{\text{MIC}_A}=0.5$	$\frac{\text{MIC}_M(B)}{\text{MIC}_M}=0.25$	FIC _X + FIC _Y = 0.75
A + B	MIC _A (B)=0.039, MIC _B (A)=31.25	$\frac{\text{MIC}_A(B)}{\text{MIC}_A}=0.5$	$\frac{\text{MIC}_B(A)}{\text{MIC}_B}=0.5$	FIC _X + FIC _Y = 1.0
M + B	MIC _M (B)=15.6, MIC _B (M)=31.25	$\frac{\text{MIC}_M(B)}{\text{MIC}_M}=0.5$	$\frac{\text{MIC}_B(M)}{\text{MIC}_B}=0.5$	FIC _X + FIC _Y = 1.0

表 3 三种药物联合抗菌作用试验结果($n=2$)

Tab 3 The anti-bacteria effect of three medicine in combination

	MIC / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	FIC _A	FIC _M	FIC _B	FIC
MIC _A + (M · B)	0.039	$\frac{\text{MIC}_A(M \cdot B)}{\text{MIC}_A}=0.5$			FIC _A + FIC _M = 0.75
MIC _M + (A · B)	7.8		$\frac{\text{MIC}_B(M \cdot B)}{\text{MIC}_M}=0.25$		
MIC _B + (A · M)	15.6			$\frac{\text{MIC}_B(A \cdot M)}{\text{MIC}_B}=0.25$	FIC _A + FIC _B = 0.75

4 讨论

4.1 幽门螺杆菌(HP)与胃及十二指肠溃疡之间有着紧密的联系,一般认为 HP 感染引起胃泌素增高是消化道溃疡发病的重要机制。HP 可产生大量尿素酶,在胃中生成氨,诱发机体产生免疫反应,使胃泌素等分泌紊乱,胃酸分泌过多,使胃黏膜的疏水性下,引发胃黏膜局部炎症反应,破坏正常的胃黏膜屏障,从而可能诱发胃及十二指肠溃疡。近年来临床上根治 HP 感染很困难,究其原因,主要是广谱抗菌药物的广

泛使用或不恰当的使用,造成 HP 耐药株不断上升和耐药性越来越强,而 HP 的耐药机制相当复杂,对不同药物耐受机制亦不同,至今很少能搞清楚。因此,针对性的研发高效和高选择性的抗 HP 药物就很困难。本研究的出发点,就是采用一种与 HP 感染有关的消化道溃疡联合用药方案,通过体外抗 HP 试验,了解药物之间是否有协同、累加或拮抗作用,联合用药中哪个药是起主导作用。本试验结果提示,在临床 HP 感染的治疗中,应该根据患者情况,通过药敏试验,选择正确的抗菌药物,灵活使用药物组合进行治疗,是根除 HP 感染的关键所在。

4.2 目前临床治疗 HP 感染,基本方案仍是铋剂-抗菌药物联合的三联疗法和质子泵抑制剂-抗菌素联合疗法。然而,其治疗效果却不太理想,治疗失败原因之一是患者依从性较差^[5],不能够按治疗方案坚持联合使用药物。据此,有的药研发机构和医疗机构希望能将联合用药品做成复方制剂,方便患者服用。笔者认为是不妥当的,临床根治 HP 感染失败的主要原因是 HP 对抗菌药物产生耐药性,固定处方的复方药物虽然使用方便,但只对部分敏感患者有效果,必然会导致临床滥用抗菌药物,使 HP 的耐药性不断增强。

4.3 本实验结果提示,联合用药治疗 HP 感染的效果主要是其中的一种抗菌药物的贡献,而联合用药的好处是在保

证治疗效果的前提下,减少每种药品的使用剂量,从而降低药物的不良反应和医疗成本。

REFERENCES

- [1] WANG J D. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*[J]. Foreign Med Sci (Section of Digestive Disease)(国外医学科学·消化道疾病分册), 1994,14(1):14-16.
- [2] GRAHAM D Y, LEW G M, MALATY H M, *et al.* Factors in influencing the eradication of *Helicobacter pylori* with triple therapy[J]. Gastroenterology(胃肠病学杂志), 1992,102:493-495.
- [3] WANG H. The treatment after the cure failure of *Helicobacter pylori* infection[J]. World Clinical Drugs(世界临床药物杂志), 2003,12(24):722-724.
- [4] LI Y L. Clinical Microbiology and detection(临床微生物学及检测)[M]. People's Medical Publishing House No. 1, 1995:85-95.
- [5] LIAN J X, CARRICK J, DASKALAPOULOS G. Metronidazole resistance significantly affects eradication of *Helicobacter pylori* infection[J]. Gastroenterology(胃肠病学杂志), 1993, 104: 133-135.

收稿日期:2006-11-10