

黄芩苷消除鲍曼不动杆菌耐药质粒的实验研究

汪东海¹, 陈敏¹, 姜志强¹, 王萍¹, 陈学锋¹, 徐菊玲^{2*} (1.湖州市第一人民医院, 浙江 湖州 313000; 2.湖州师范学院医学院, 浙江 湖州 313000)

摘要: 目的 探讨黄芩苷能否消除鲍曼不动杆菌质粒, 并影响抗菌药物对细菌的最低抑菌浓度(MIC)。方法 测定黄芩苷处理的鲍曼不动杆菌生长曲线。16株庆大霉素和环丙沙星双重耐药的鲍曼不动杆菌, 经黄芩苷作用20 h, 分别在处理前和处理后应用碱裂解法检测质粒, 琼脂稀释法测定抗菌药物 MIC。结果 黄芩苷能抑制鲍曼不动杆菌生长。16株鲍曼不动杆菌耐药株均携带质粒, 经 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芩苷作用后, 质粒消除率为 37.5%(6/16)。6株经黄芩苷消除质粒的细菌, 庆大霉素中度水平或低水平耐药株的 MIC 值均下降至敏感水平; 环丙沙星低水平耐药株的 MIC 值下降至敏感水平, 部分环丙沙星中度水平耐药株的 MIC 值下降但高于耐药水平。结论 黄芩苷能够消除鲍曼不动杆菌低水平耐药株携带的质粒, 恢复菌株对庆大霉素和环丙沙星的敏感性, 可用于鲍曼不动杆菌低水平耐药株感染辅助治疗。

关键词: 黄芩苷; 质粒; 鲍曼不动杆菌; 庆大霉素; 环丙沙星

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)05-0400-05

基金项目: 湖州市科技计划项目(2010YSB04)

作者简介: 汪东海, 男, 副主任药师 Tel: (0572)2023728 E-mail: donghaiwang5805@yahoo.cn *通信作者: 徐菊玲, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0572)2322042 E-mail: xjl0125@hutc.zj.cn

Experimental Study of Baicalin Curing Antibiotic-Resistant Plasmid in *Acinetobacter Baumannii*

WANG Donghai¹, CHEN Min¹, JIANG Zhiqiang¹, WANG Ping¹, CHEN Xuefeng¹, XU Juling^{2*} (1.Zhejiang Province Huzhou First People's Hospital, Huzhou 313000, China; 2.Medical School of Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate if baicalin was able to cure antibiotic-resistant plasmid in *Acinetobacter baumannii*, and affect minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics to bacteria. **METHODS** The growth curve of *A. baumannii* treated with baicalin was detected. 16 strains of *A. baumannii*, gentamicin(GEN) and ciprofloxacin(CIP) resistance, were treated with baicalin for 20 hours. Before and after baicalin treatment, plasmids of *A. baumannii* were determined with alkaline lysis method, and MICs of GEN and CIP were measured by agar dilution method. **RESULTS** Baicalin inhibited the growth of *A. baumannii*. The plasmid curing rate was 37.5%(6/16) in 16 strains of *A. baumannii* with plasmids, after the treatment with baicalin (1 mg·mL⁻¹). In 6 strains of *A. baumannii* with plasmid cured by baicalin, for medium or low level of GEN-resistance strains, MICs of GEN all decreased to sensitive level; for low level of CIP-resistance strains, MICs of CIP all dropped to sensitive level, and for some medium-level of CIP-resistance strains, MICs of CIP also dropped, but still above the resistance level. **CONCLUSION** Baicalin can eliminate plasmids of *A. baumannii* with low level of antibiotic-resistance, and make these strains recover the susceptibility to GEN and CIP, which shows an adjuvant treatment method for antibiotic-resistant *A. baumannii* infections.

KEY WORDS: baicalin; plasmid; *Acinetobacter baumannii*; gentamicin; ciprofloxacin

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要条件致病菌,常引起呼吸道感染、泌尿系统感染、败血症、继发性脑膜炎等疾病^[1]。近年来,鲍曼不动杆菌临床分离率上升至非发酵菌的前两位,且耐药菌株呈增多趋势^[2],给临床治疗带来了极大挑战,迫切需要发展新的治疗方案或新型药物。

鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类、氟喹诺酮类以及β-内酰胺类等抗生素的耐药性与菌株携带的耐药质粒密切相关^[3-5]。体外实验表明,十二烷基硫酸钠等化学物质能够消除细菌携带的耐药质粒,使得耐药菌株恢复药物敏感性^[6]。我国传统中药材黄芩对绿脓杆菌、链球菌、葡萄球菌等细菌具有抑菌功效,机制尚不十分清楚^[7]。本文探讨黄芩是否能够消除鲍曼不动杆菌耐药质粒,进而影响药物对细菌的最低抑菌浓度(MIC),为黄芩与抗生素联合应用治疗鲍曼不动杆菌耐药株感染提供实验依据,报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株

16株耐药性鲍曼不动杆菌,2010年1月至12月分离自湖州市区医院临床标本,经K-B纸片法证实为庆大霉素(gentamicin, GEN)和环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)双重耐药菌株,碱裂解法证实携带质粒。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、金黄色葡萄球菌 ATCC25923(卫生部临床检验中心)。

1.2 主要试剂

庆大霉素(10 μg·片⁻¹)、环丙沙星(5 μg·片⁻¹)2

种药敏纸片(杭州天和微生物公司)。庆大霉素、环丙沙星(中国药品生物制品检定所)。黄芩苷(成都思美特公司,含量99.9%,色谱纯)。水解酪蛋白(MH)肉汤以及MH琼脂(英国Oxoid公司),胰蛋白胨和酵母浸出物(英国Difco公司)。质粒提取试剂(杭州爱思进公司)。

1.3 琼脂稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)^[8]

按2010年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)规定的标准进行。制备系列稀释浓度的单一抗菌药物MH平板,将待测鲍曼不动杆菌复苏,再接种于上述MH平板(10⁴ CFU·接种点⁻¹),37℃培养16 h,观察结果。每次操作均包含质控菌株。MIC结果判断:MH平板上细菌生长明显减少的药物浓度判断为MIC终点。

1.4 细菌生长曲线测定

将鲍曼不动杆菌敏感菌株和耐药菌株复苏,用生理盐水调整菌液浓度至1×10⁸~2×10⁸ CFU·mL⁻¹。取96孔培养板,每孔加MH培养液500 μL,然后加入适量黄芩苷原液(10 mg·mL⁻¹),得到含0.1, 0.5, 1, 5 mg·mL⁻¹黄芩苷MH培养液,每孔再加入10 μL菌液(终浓度1×10⁶ CFU·mL⁻¹),放35℃温箱培养20 h,每隔2 h测定490 nm波长下的吸光度(A₄₉₀)。各时间点设平行3孔,以平均A₄₉₀值代表细菌生长情况。设立0 mg·mL⁻¹黄芩苷MH培养液对照。为排除黄芩苷自身吸光度的影响,将各时间点的平均A₄₉₀值减去对应浓度黄芩苷自身吸光值,得到校正平均A₄₉₀值。以校正平均A₄₉₀值为纵坐标,时间为横坐标绘制细菌生长曲线。

1.5 质粒检测

16株耐药性鲍曼不动杆菌分别接种于MH液体培养基, 37℃培养16h, 离心收集细菌, 采用碱裂解法提取质粒, 操作严格按照试剂盒说明书进行。质粒提取产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, EB染色后紫外线照射观察质粒条带并拍照, 得到各菌株质粒谱。实验重复3次。

1.6 质粒消除

应用二甲亚砜将黄芩苷配成 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 原液, 取适量原液加入到MH液体培养基中, 得到含 $0.1\sim 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷的MH培养液。将16株耐药性鲍曼不动杆菌复苏, 调节菌液浓度为 $2\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌液分别接种于含不同浓度黄芩苷的MH培养液中, 37℃避光培养20h, 收集菌液分装于两管。一管菌液采用“1.3”

项下方法测定细菌对头孢噻肟、庆大霉素、环丙沙星的MIC, 另一管菌液离心沉淀后按照“1.5”项下方法进行质粒检测。计算质粒消除率, 公式为: 质粒消除率=(质粒被消除的菌株例数/菌株总例数) $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 黄芩苷对鲍曼不动杆菌的生长影响

经 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷处理的鲍曼不动杆菌, 敏感株生长曲线(图1A的S1、S2)位于对照株生长曲线(图1A的CS1、CS2)下方, 耐药株生长曲线(图1B的R1、R2)位于对照株生长曲线(图1B的CR1、CR2)下方; 与对照株比较, 敏感株及耐药株生长曲线下降幅度较小, 下降趋势接近。以上结果提示, 黄芩苷对鲍曼不动杆菌敏感株及耐药株生长有轻度抑制作用。

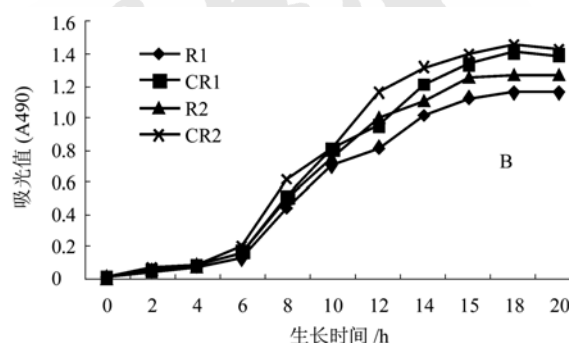
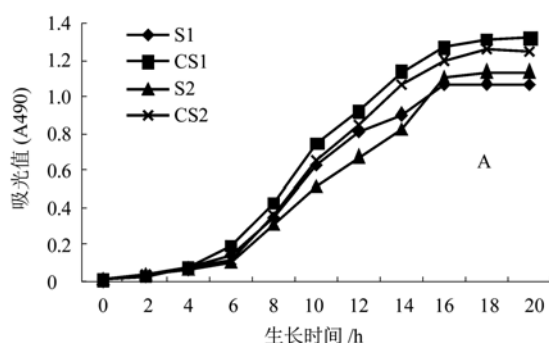


图1 黄芩苷($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)对鲍曼不动杆菌生长的影响(A490)

A-S1、S2: 敏感株+黄芩苷, CS1、CS2: 敏感株对照; B-R1、R2: 耐药株+黄芩苷, CR1、CR2: 耐药株对照

Fig 1 Effect of baicalin($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the growth curves of *A. baumannii*

A-S1, S2: sensitive strains + baicalin, CS1, CS2: control of sensitive strains; B-R1, R2: resistant strains + baicalin, CR1, CR2: control of resistant strains

2.2 黄芩苷引起耐药菌株质粒消除

3株鲍曼不动杆菌耐药株携带的质粒大小约20 kb(图2的1, 2, 3泳道), 经 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷处理后, 未检出质粒条带, 提示质粒被消除(图2的5, 6, 7泳道)。

2.3 不同浓度黄芩苷对耐药菌株质粒的消除率

浓度为 $0.1\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷对鲍曼不动杆菌耐药菌株的质粒消除率介于 $6.3\%\sim 37.5\%$, 且与黄芩苷浓度呈剂量依赖性。高浓度的黄芩苷($1\sim 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)对质粒的消除率未显示剂量依赖性增加。 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷分别处理16株鲍曼不动杆菌耐药株, 其中6株细菌发生质粒消除, 质粒消除率为 37.5% 。结果见图3。

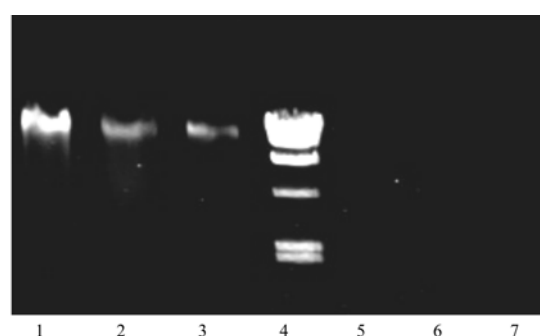


图2 黄芩($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)对鲍曼不动杆菌耐药株质粒的影响
1-R1株; 2-R2株; 3-R3株(未处理); 4-分子量标准(23, 9.4, 6.5, 4.4, 2.3, 2 kb); 5-R1株; 6-R2株; 7-R3菌株(处理后)

Fig 2 Effect of baicalin($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) on plasmids of antibiotic-resistant *A. baumannii*

1-R1 strain; 2-R2 strain; 3-R3 strain(no treatment); 4-molecular weight marker(23, 9.4, 6.5, 4.4, 2.3, 2 kb); 5-R1 strain; 6-R2 strain; 7-R3 strain(treatment)

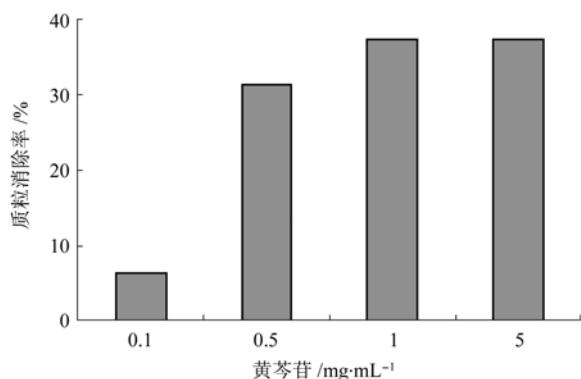


图3 质粒消除率与黄芩苷浓度的关系

Fig 3 The relationship between rates of plasmid curing and baicalin concentrations

2.4 黄芩苷对耐药菌株 MIC 的影响

对于黄芩苷处理后能发生质粒消除的 6 株鲍曼不动杆菌耐药菌,庆大霉素高水平耐药株(MIC $\geq 64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)中,部分菌株 MIC 值下降,但未恢复药物敏感性(庆大霉素 MIC $\leq 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为敏感);庆大霉素中度水平或低水平耐药株 (MIC $\leq 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 MIC 值均下降且恢复药物敏感性;环丙沙星高水平耐药菌株(MIC $\geq 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 MIC 值未见改变;环丙沙星中度水平耐药株(MIC $8\sim 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 中,部分菌株 MIC 值下降,但未恢复药物敏感性(环丙沙星 MIC $\leq 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为敏感);环丙沙星低水平耐药株(MIC $\leq 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 MIC 值下降且菌株恢复药物敏感性。

表 1 黄芩苷消除质粒后的菌株 MIC 变化(MIC, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Tab 1 Changes of MIC in bacteria with plasmid curing by baicalin(MIC, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

菌株 编号	庆大霉素 MIC		环丙沙星 MIC	
	消除前	消除后	消除前	消除后
R1	16	0.5	4	0.5
R2	16	1	8	4
R3	32	4	8	8
R4	64	8	16	16
R5	128	64	32	32
R6	256	256	64	64

注:庆大霉素 MIC ≤ 4 敏感, MIC ≥ 16 耐药; 环丙沙星 MIC ≤ 1 敏感, MIC ≥ 4 耐药^[8]

Note: MIC of GEN ≤ 4 S, ≥ 16 R; MIC of CIP ≤ 1 S, ≥ 4 R^[8]

3 讨论

近年来,鲍曼不动杆菌耐药现象十分严重,对氨基糖苷类、氟喹诺酮类以及 β -内酰胺类等抗生素均产生了一定的耐药性,并且耐药菌株播散迅速,给临床治疗造成了极大困难。鲍曼不动杆

菌耐药机制主要有^[9-11]:①细菌染色体上耐药相关基因发生突变,主要包括青霉素结合蛋白编码基因突变、拓扑异构酶基因突变、外膜孔蛋白编码基因突变。②细菌出现新的酶基因,能表达降解药物或改变药物靶点的酶,主要有超广谱 β -内酰胺酶或碳青霉烯酶基因、氨基糖苷类修饰酶基因。③细菌外排泵蛋白编码基因过度表达导致多重耐药,主要有 AdeABC 基因。鲍曼不动杆菌的以上耐药相关基因在染色体和质粒上均有分布,主要通过转化、接合、转导、转座等方式在细菌之间播散,尤其需要警惕的是,质粒接合方式可造成细菌耐药迅速扩散^[12-14]。就理论而言,消除耐药菌株携带的质粒,可引起质粒上的耐药相关基因缺失,从而使耐药菌株重新恢复药物敏感性。

黄芩是一种传统中药材,主要活性成分为黄芩苷,能抑制多种细菌生长,但抗菌机理尚不十分清楚^[7]。本文观察到,黄芩苷在体外对鲍曼不动杆菌敏感株及耐药株生长具有轻度抑制作用,这也提示单独应用黄芩苷治疗鲍曼不动杆菌耐药株感染难于获得满意效果。为了探讨黄芩苷对鲍曼不动杆菌耐药株的其他生物学作用,本文在体外将黄芩苷与鲍曼不动杆菌耐药株相互作用,结果证实黄芩苷能够消除鲍曼不动杆菌部分菌株的耐药质粒,在 $0.1\sim 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷浓度范围内,质粒消除率与黄芩苷浓度呈剂量依赖性。对于 $1\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷,质粒消除率维持在 37.5%,未随黄芩苷剂量的上升而上升。本文认为,造成以上现象的原因是:黄芩苷对质粒的消除作用受到细菌自身携带的质粒种类影响。只有部分种类的质粒可以被黄芩苷消除。对于这部分质粒,在一定浓度范围内,质粒消除率与黄芩苷剂量成依赖关系。一旦这部分质粒被消除,余下的非消除型质粒仍将留在细菌体内,提高黄芩苷剂量也不能使之消除,因此质粒消除率不会上升。

考虑到黄芩苷的体内生物利用度,本文选取 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷为实验浓度。对于经 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩处理后能发生质粒消除的鲍曼不动杆菌耐药株,本文观察到:①庆大霉素中度水平或低水平耐药株以及环丙沙星低水平耐药株,质粒消除后 MIC 值均下降至敏感水平,提示庆大霉素中、低水平耐药以及环丙沙星低水平耐药主要是由质粒上的耐药基因引起;②环丙沙星高水平耐药菌株,质粒消除后 MIC 值未见改变,提示环丙沙星高水

平耐药由染色体上的耐药基因引起；③庆大霉素高水平耐药或环丙沙星中度水平耐药株中的部分菌株，质粒消除后 MIC 值下降但未恢复药物敏感性，提示部分菌株的庆大霉素高水平耐药或环丙沙星中度水平耐药是由染色体和质粒上的耐药基因共同作用所致，消除质粒后并不影响染色体上耐药基因的表达，使得菌株仍为耐药表型。

总之，黄芩苷可以使鲍曼不动杆菌低水平耐药菌株恢复对庆大霉素和环丙沙星的敏感性，为鲍曼不动杆菌耐药菌感染的辅助治疗带来了新方法，也有利于减少多重耐药菌株的产生。

REFERENCES

- [1] WANG H, SUN H L, NING Y Z, et al. Molecular mechanism of multiple-drug and pan-drug resistance among *Acinetobacter* species [J]. *Natl Med J Chin*(中华医学), 2006, 86(1): 17-22.
- [2] WANG Q, MENG S F, GUAN G, et al. Antimicrobial resistance analysis among 3775 clinical isolated Gram-negative Bacilli [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药), 2009, 26(5): 428-431.
- [3] NIGRO S J, POST V, HALL R M, et al. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(7): 1504-1509.
- [4] CORVEC S, CAROFF N, ESPAZE E, et al. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52 (4): 629-635.
- [5] TOUATI A, BRASME L, BENALLAOUA S, et al. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(3): 287-290.
- [6] LOU K, BAN R, ZHAO X M. Plasmid curing in bacteria [J]. *Microbiology*(微生物学通报), 2002, 29(5): 99-103.
- [7] MA F, CHEN Y, LI J, et al. Screening test for anti-*Helicobacter pylori* activity of traditional Chinese herbal medicines [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(44): 5629-5634.
- [8] CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement [S]. CLSI, 2011(M100-S21): 51-62.
- [9] LEE K, YONG D, YUM J H, et al. Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(2): 942-944.
- [10] LIN M F, CHANG K C, YANG C Y, et al. Role of integrons in antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63(6): 440-443.
- [11] CHU Y W, CHAU S L, HOUANG E T. Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(Pt 4): 477-478.
- [12] LEE Y, YUM J H, KIM C K, et al. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the blaOXA-66 gene [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2010, 40(1): 43-48.
- [13] KANG H Y, KIM J, SEOL S Y, et al. Characterization of conjugative plasmids carrying antibiotic resistance genes encoding 16S rRNA methylase, extended-spectrum beta-lactamase, and/or plasmid-mediated AmpC beta-lactamase [J]. *J Microbiol*, 2009, 47(1): 68-75.
- [14] BRATU S, LANDMAN D, MARTIN D A, et al. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(9): 2999-3005.

收稿日期: 2011-07-27