

裸花紫珠联合万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌致大鼠肺炎模型的协同抗菌作用研究

谢泳超¹, 谷陟欣², 朱丽¹, 黄胜², 钟志红¹, 宁宁¹, 冯星^{1*}

1. 湖南师范大学医学院 药理学系, 湖南 长沙 410013

2. 九芝堂股份有限公司, 湖南 长沙 410000

摘要: 目的 观察裸花紫珠联合万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)所致大鼠肺炎模型的协同抗菌作用, 为临床上治疗 MRSA 所致的感染提供一种更安全有效的治疗方法。方法 将 80 只健康雄性 SD 大鼠随机分成 8 组, 10 只作为对照组, 其余大鼠从左侧鼻腔分别滴入 200 μ L MRSA (1×10^8 CFU/mL) 菌液造模。每天记录观察饮食、饮水量情况及大鼠活动度, 持续给药 10 d 后观察大鼠血液白细胞数、肺部载菌量和组织病理学变化。结果 裸花紫珠联合盐酸万古霉素各组与模型组相比, 白细胞计数均下降明显 ($P < 0.05$); 大鼠肺部的载菌量明显降低 ($P < 0.05$), 肺组织病理损伤程度均明显减轻。结论 裸花紫珠联合盐酸万古霉素对 MRSA 有协同抗菌作用, 能更好地治疗 MRSA 引起的肺炎, 可提高抗生素对耐药菌疗效, 缩短疗程。

关键词: 裸花紫珠; 盐酸万古霉素; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 协同抗菌作用; 肺炎

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)17-3070-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.018

Synergistic antibacterial effect of association of *Callicarpa nudiflora* and Vancomycin Hydrochloride towards rat model of MRSA pneumonia

XIE Yong-chao¹, GU She-xin², ZHU Li¹, HUANG Sheng², ZHONG Zhi-hong¹, NING Ning¹, FENG Xing¹

1. Department of Pharmacy, The Medicine College of Hunan Normal University, Changsha 410013, China

2. Jiuzhitang Group Co., Ltd., Changsha 410000, China

Abstract: **Objective** To investigate the synergistic antibacterial effect of *Callicarpa nudiflora* associated with Vancomycin Hydrochloride on the pneumonia model rats infected by methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA), and to provide a safer and more effective treatment of clinical ideas for the treatment of infections caused by MRSA. **Methods** Totally 80 NIH female rats were randomly divided into eight groups, ten rats as the control group, and 200 μ L MRSA (1×10^8 CFU/mL) bacteria was dropped in the left nasal cavity of the remaining rats to produce infected animal model. The administration with drug respectively by group was continued for 10 d. The common state including activity and intake of water and food were observed and noted. After administration for 10 d, the count of leucocyte, microbial load, and histopathological change of lung were observed. **Results** Compared with the model group, the absolute value of leucocyte and microbial load of association of *C. nudiflora* and Vancomycin Hydrochloride were reduced significantly ($P < 0.05$). The pathological damage alleviated significantly. **Conclusion** Association of *C. nudiflora* and Vancomycin Hydrochloride has the synergistic antibacterial effect towards MRSA, which can improve the curative effect of antibiotics and shorten the period of treatment.

Key words: *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.; Vancomycin Hydrochloride; Methicillin-resistant staphylococcus aureus; synergistic antibacterial effect; pneumonia

近年来耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)在金黄色葡萄球菌感染中所占的比例越来越高, 由于其多重耐药, 其播散已经引起了全球的关注, 在

美国大型教学医院 MRSA 占金黄色葡萄球菌感染的 60%~80%^[1]。MRSA 除了对甲氧西林有耐药性外, 还对临床上应用的多种抗生素具有耐药性, 所

收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目重点项目(201204); 湖南省科技厅项目(2012RS4020, 2014SK3238); 长沙市科技局一般项目(K1203004-31); 海南省中药现代化专项(2012ZY020)

*通信作者 冯星 Tel: (0731)88912473 E-mail: fengxing01@hotmail.com

导致的感染呈暴发性或散发性流行,治疗极其困难,致死率极高,成为全世界范围内抗感染的难题^[2]。其耐药性不断增强,甚至出现对万古霉素耐药^[3]的菌株,这对临床治疗提出严峻挑战,近年有研究表明,清热解毒类中药^[4-6]具有较好的抑菌作用。裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 主要产于我国广东、广西、贵州等地,是一种传统中药材,其药效主要体现为抗炎、解毒、收敛、止血。临床一般用于炎症如肺炎和急性传染性肝炎^[7]。前期实验研究表明裸花紫珠对常见甚至耐药菌都有较好的抑菌效果^[8],但其用于 MRSA 的治疗尚缺乏深入的实验研究。本实验通过观察裸花紫珠联合盐酸万古霉素在大鼠肺炎模型^[9-11]中对 MRSA 协同抗菌作用,阐明中西药联合应用^[12-13]对耐药菌的作用效果,为进一步研究裸花紫珠对耐药菌抑菌作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 MRSA 菌株

MRSA 菌株由中南大学湘雅医学院附属第二医院临床检验科提供,为临床患者痰液经分离纯化培养所得,纸片扩散法(K-B法)鉴定为 MRSA。

1.2 药物与试剂

裸花紫珠干浸膏(主要成分含黄酮类 0.86 mg/g、酚类 3.12 mg/g、萜类 0.23 mg/g,批号 20140619) 10 g,九芝堂股份有限公司惠赠。盐酸万古霉素粉针(冻干),500 mg/支,Eli Lilly Japan k. k.,批号 Wm21142。蒲地蓝消炎片,云南白药集团股份有限公司,0.3 g/片,批号 20140817。M-H 琼脂培养基,北京陆桥技术有限责任公司。

1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠 80 只,6 周龄,体质量(200±10) g,购自长沙市开福区东创实验动物科技服务部,生产许可证号 SCXK(湘)2014-0012。于动物室适应性饲养 3 d 后用于实验,实验期间控制温度在(25±2)℃,湿度 48%,自由进水、饮食。

2 方法

2.1 菌液制备

以 0.9%生理盐水(NS)配制菌悬液,用比浊仪将菌浓度调节至 1.0×10^8 CFU/mL。

2.2 动物分组、模型制备及给药

取 80 只大鼠随机分成 8 组,每组 10 只,具体分组、给药剂量及给药途径见表 1。大鼠乙醚轻度麻醉,除对照组外,其余各组大鼠均从左侧鼻腔分别滴入 200 μL MRSA (1×10^8 CFU/mL) 菌液,对

表 1 实验动物分组及给药情况

Table 1 Animal grouping and administration

组别	ig 给药剂量	ip 给药剂量
对照	NS 溶液 2 mL·d ⁻¹	NS 溶液 2 mL·d ⁻¹
模型	NS 溶液 2 mL·d ⁻¹	NS 溶液 2 mL·d ⁻¹
万古霉素	NS 溶液 2 mL·d ⁻¹	万古霉素 10 mg·kg ⁻¹
蒲地蓝消炎片	蒲地蓝消炎片 1.08 g·kg ⁻¹	NS 溶液 2 mL·d ⁻¹
裸花紫珠	裸花紫珠 0.6 g·kg ⁻¹	NS 溶液 2 mL·d ⁻¹
裸花紫珠+	裸花紫珠 0.3 g·kg ⁻¹	万古霉素 5 mg·kg ⁻¹
万古霉素	裸花紫珠 0.6 g·kg ⁻¹	万古霉素 5 mg·kg ⁻¹
	裸花紫珠 1.2 g·kg ⁻¹	万古霉素 5 mg·kg ⁻¹

照组滴入 200 μL 无菌 NS 溶液,接种后将大鼠保持直立 1 min 以保证大鼠充分吸收,连续感染 3 d,待大鼠出现肺炎临床症状^[14],随机选取模型组大鼠 2 只,处死,无菌肺匀浆涂于高盐甘露醇平板上,发现有金黄色葡萄球菌生长后,将菌种接种于普通琼脂平板上,置 37℃温箱中培养 18 h,将配好的细菌做药敏实验,检验细菌是否为耐药菌株,证明感染菌株确实为耐药菌株。以上实验证明模型成功,并且致病菌确为 MRSA 后,各组进行给药治疗,均连续给药 10 d。

2.3 观察内容及检测指标

每日定时记录观察大鼠饮食、饮水、活动等情况。于给药第 10 天将所有大鼠股动脉放血处死,进行白细胞计数^[15]。大鼠肺部载菌量计数:大鼠处死后立即将大鼠肺取出,无菌研磨匀浆并涂于高盐甘露醇培养基上,37℃培养 24 h 后进行细菌计数^[16]。观察肺部组织病理学改变^[17]。

2.4 统计学方法

统计分析软件 SAS For Windows V8.2,采用最小显著差(LSD-*t*)单因素方差分析。

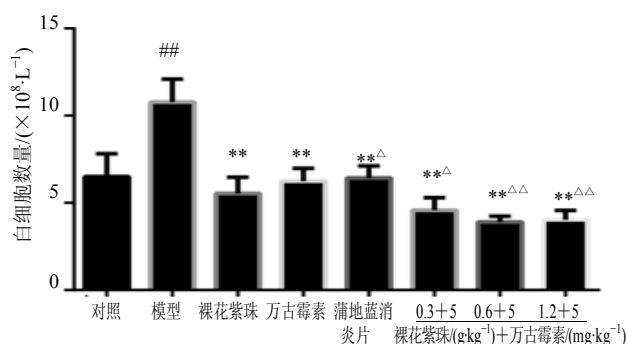
3 结果

3.1 大鼠临床症状观察

在整个实验周期内,模型组和药物组大鼠精神状态轻度萎靡不振,缺乏活力,进食量和饮水量都较少,毛色暗淡,并且出现明显的立毛现象。随着感染时间延长,大部分逐渐恢复,精神状态有所好转,进食和饮水量都有所增加。对照组大鼠在整个实验周期内大体观察未见异常。

3.2 大鼠血液白细胞计数

于给药第 10 天将所有大鼠股动脉放血处死,进行白细胞计数,结果见图 1。模型组大鼠血液中的白细胞数量明显高于对照组以及药物组的白细



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$;
与裸花紫珠组比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 下同
 $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ vs model group; $^{\Delta}P < 0.05$
 $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs *C. nudiflora* group; same as below

图 1 各组大鼠血液白细胞计数结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Counting of white blood cells in blood of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

胞数量 ($P < 0.01$), 提示大鼠肺炎模型造模成功, 且提示实验所选药物对 MRSA 引起的肺炎具有治疗效果。裸花紫珠组治疗后大鼠白细胞数显著低于蒲地蓝消炎片组 ($P < 0.05$), 提示在 MRSA 引起的大鼠肺炎中, 裸花紫珠的疗效明显好于蒲地蓝消炎片。药物合用的 3 个治疗组和裸花紫珠组相比较, 合用组白细胞数显著低于裸花紫珠组 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示药物合用对 MRSA 的抑制作用更明显。

3.3 大鼠肺部载菌量计数

各组大鼠肺部载菌量结果见图 2, 模型组的大鼠肺部有大量细菌 MRSA, 而对照组的大鼠肺部不含有 MRSA。进一步表明该肺炎模型建立成功。为进一步观察实验药物在大鼠体内是否具有抑菌效果, 比较模型组与药物组大鼠肺部的载菌量差异, 发现在感染后 10 d, 各给药组大鼠肺部的载菌量与模型组相比明显减少 ($P < 0.01$), 说明实验中各药物在大鼠体内均发挥了杀菌的效果, 对 MRSA 引起

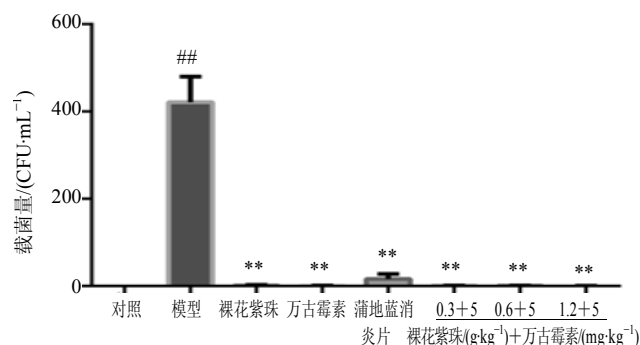


图 2 各组大鼠肺部载菌量结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Microbial load in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

的肺炎具有治疗效果。

3.4 大鼠肺部组织病理学观察结果

由图 3 可知, 对照组大鼠切片显示肺泡正常, 肺泡结构清晰, 无渗出现象。而模型组的切片显示有明显的炎症症状, 肺泡结构不清晰, 有渗出现象发生, 微血管扩张充血, 结果提示本实验造模成功, 造模大鼠肺炎感染成功。万古霉素组大鼠切片显示基本无渗出现象, 局部出现微血管扩张, 炎症症状明显减轻, 肺泡结构清晰, 表明万古霉素能很好地治愈 MRSA 引起的大鼠肺炎。蒲地蓝消炎片组大鼠切片显示炎症症状依然存在, 有渗出现象, 大规模微血管充血, 肺泡壁厚度明显增加, 有红细胞露出现象, 但较模型组比较有明显好转, 表明蒲地蓝消炎片对 MRSA 引起的肺炎有一定的治疗作用。裸花紫珠组切片显示, 肺泡结构清晰, 肺泡壁厚度均匀, 肺泡排列均匀, 但与万古霉素组比较治疗效果稍显不足, 但明显好于蒲地蓝消炎片组。合用组切片结果表示 3 组大鼠肺部损伤明显痊愈, 肺炎症状消失, 无渗出、充血等现象, 无组织损伤。提示药物合用对 MRSA 引起的肺炎有显著疗效。

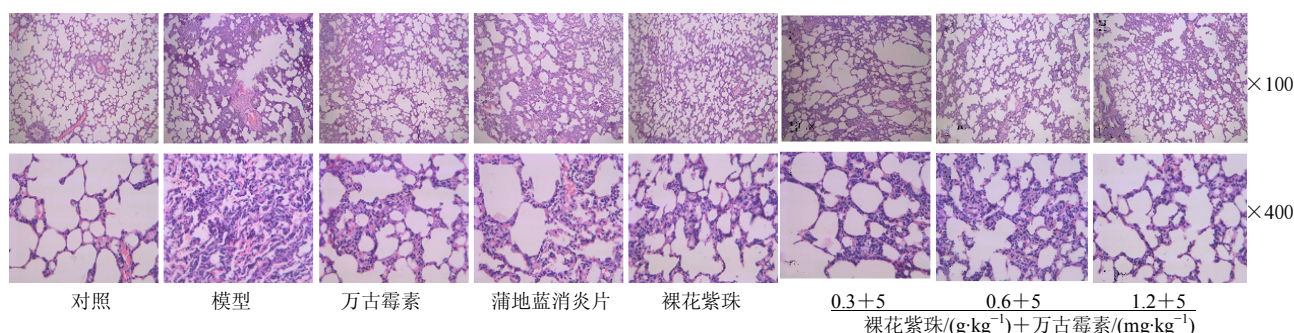


图 3 各组大鼠肺组织病理观察结果

Fig. 3 Pathological observation of lung tissue of rats in each group

4 讨论

MRSA 是临床上常见的 1 种毒性比较强的细菌,是金黄色葡萄球菌的 1 种,但能够耐甲氧西林,可引起多种化脓性疾病。MRSA 除了对甲氧西林有耐药性外,还对临床上应用的多种抗生素具有耐药性,所导致的感染呈暴发性或散发性流行,治疗极其困难,致死率极高,成为全世界范围内抗感染的难题^[18]。MRSA 曾被称为“超级病菌”,它所引起的感染,在较长时间里威胁着人们的健康^[19]。目前 MRSA 感染的治疗,万古霉素仍为首选,但其副作用大,价格昂贵,限制了其在临床上的使用。因万古霉素的长期使用,万古霉素中度敏感的金黄色葡萄球菌近几年屡有报道^[20-21]。

本实验得出裸花紫珠联用万古霉素对 MRSA 大鼠肺炎的效果显著,为临床应用裸花紫珠联合万古霉素治疗金黄色葡萄球菌感染提供实验依据。但是其作用机制尚不明确,裸花紫珠药理活性广泛,相关报道指出,裸花紫珠具有抗菌、收敛止血、增强免疫之功效^[22-23]。因此,推测裸花紫珠在 MRSA 肺炎的治疗中,不仅增强万古霉素的抗菌活性,同时,其收敛活性还能减少炎性渗出,并通过增强机体免疫力而起到增效作用。具体的作用机制还有待进一步的实验研究。

参考文献

- [1] 魏旭锐,赖天文,刘 军. 二级医院和三级医院下呼吸道金黄色葡萄球菌耐药性及 MRSA 感染危险因素研究 [J]. 中国临床研究, 2015, 28(9): 1126-1130.
- [2] 牛瑞兵,郭利平,王新刚,等. 医院获得性与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性差异 [J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(7): 476-482.
- [3] 袁本清,宋发谷,张爱群,等. 金黄色葡萄球菌耐药性变迁探讨 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(24): 5989-5991.
- [4] 杨明炜,陆付耳,徐丽君,等. 20 种清热解毒中药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抗药性的影响 [J]. 中草药, 2004, 35(7): 799-800.
- [5] 陈 晴,谢鲲鹏,云宝仪,等. 黄柏等中草药对 MRSA 的抑菌作用及其对质粒的消除作用 [J]. 微生物学杂志, 2013, 33(3): 54-58.
- [6] Llall K G, Iuliano C A, Llaase K K, et al. Lmpiric guideline-recommended weight-basd vancomycin dosing and mortality in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: a retrospective cohort study [J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1): 104-115.
- [7] 蔡金平,董 琳,关薇薇,等. 裸花紫珠的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 60-64.

- [8] 周 覃,谷陟欣,刘 翀,等. 裸花紫珠联合万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌协同抗菌作用的动物实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(10): 3075-3078.
- [9] 罗 琴,夏 欢,杨新玲. 42 例社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌肺炎的临床特点及预后因素的分析研究 [J]. 川北医学院学报, 2015, 30(4): 451-455.
- [10] 王 芊,华 川. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌在肺炎致病机制中的研究进展 [J]. 解放军医药杂志, 2012, 24(5): 43-46.
- [11] 孙 琦,王湘雨,陈诗琪,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠腹膜炎模型的建立 [J]. 生命科学研究, 2015, 19(1): 54-58.
- [12] Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia [J]. *Science*, 2006, 315(5815): 1130-1133.
- [13] 傅瑞春. 8 种植物抗菌成分与抗菌剂联用抗耐药菌作用的研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2013.
- [14] 赵振江,赵瑞斌,姚泽忠. 建立幼龄 SD 大鼠肺炎克雷伯杆菌肺炎模型的一种新方法 [J]. 中国现代医生, 2013, 47(5): 21-23.
- [15] 吴细丕. NIH 小鼠的白细胞计数 [J]. 中国实验动物学杂志, 1994, 3(1): 51-53.
- [16] 王至婉,李建生,余学庆,等. 抗菌药物治疗细菌性肺炎疗效指标与标准的分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(12): 714-716.
- [17] 叶 清,李燕芹. 肺纤维化动物模型 [J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(8): 1248-1251.
- [18] 安 娜. 利奈唑胺治疗院内耐甲氧西林金黄色葡萄球菌肺炎的疗效研究 [J]. 现代诊断与治疗, 2014, 25(18): 4171-4176.
- [19] Lppolito G, Leone S, Lauria F N, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sup-erbug [J] *Int J Infect Dis*, 2010, 14 (Suppl4): 7-11.
- [20] Teshome B F, Lee G C, Reveles K R, et al. Application of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* risk score for community-onset pneumonia patients and outcomes with initial treatment [J]. *Infect Dis*, 2015, 7(1): 1119-1121.
- [21] Shorr A F, Zilberberg M D, Micek S T. Outcomes associated with bacteremia in the setting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia: a retrospective cohort study [J]. *Crit Care*, 2015, 312(19): 1029-1039.
- [22] 张铃铃,陈剑云. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的药物治疗进展 [J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(4C): 169-170.
- [23] 倪双龙,魏志平. 社区获得性 MRSA 感染的耐药性分析 [J]. 现代实用医学, 2014, 26(9): 1108-1109.