

水飞蓟宾及其同分异构体的抑菌谱及其与抗生素联合抑菌效应探讨

谢思露, 赵茂吉, 杨朝国*

成都中医药大学医学技术学院, 四川 成都 610075

摘要: **目的** 探讨水飞蓟宾及其同分异构体的体外抗菌谱及水飞蓟宾与临床常用抗生素的联合抑菌效应。**方法** 用微量肉汤稀释法测定水飞蓟宾及其同分异构体对临床感染常见细菌的6种标准菌株和6种临床分离菌株(74株)的最低抑菌浓度(MIC)。用平板菌落计数法测定不同质量浓度水飞蓟宾对6种标准菌株的生长抑制曲线。用棋盘微量肉汤稀释法进行水飞蓟宾与临床常用抗生素的联合药敏试验, 计算联合抑菌指数(FIC), 判定水飞蓟宾与抗生素的联合抑菌效应。**结果** 水飞蓟宾对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和屎肠球菌标准菌株的MIC为50~400 µg/mL, 对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌标准菌株的MIC均>400 µg/mL; 对表皮葡萄球菌临床分离菌株的MIC分别为100、200、400、>400 µg/mL, 对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和屎肠球菌临床分离菌株的MIC分别为400、>400 µg/mL; 对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌临床分离菌株的MIC均>400 µg/mL。水飞蓟宾其他同分异构体对6种标准菌株的MIC为≥400 µg/mL。水飞蓟宾对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和屎肠球菌标准菌株的生长曲线都有明显抑制作用, 抑制效果随药物质量浓度增加而增加, 对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌标准菌株的生长曲线无影响。水飞蓟宾与青霉素/红霉素联用对革兰阳性试验菌的FIC以 $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ 和 $1 < \text{FIC} \leq 2$ 为主, 水飞蓟宾与环丙沙星或庆大霉素联用对革兰阴性试验菌的FIC以 $\text{FIC} > 2$ 或 $1 < \text{FIC} \leq 2$ 为主。**结论** 水飞蓟宾对革兰阳性菌有较好的抑菌活性, 其中对表皮葡萄球菌抑菌活性最强。水飞蓟宾的抑菌活性明显高于其他同分异构体。水飞蓟宾与青霉素/红霉素联用主要为相加和无关作用, 与环丙沙星或庆大霉素联用主要为拮抗或无关作用。

关键词: 水飞蓟宾; 同分异构体; 最小抑菌浓度; 细菌生长曲线; 联合抑菌效应

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)07-1641-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.022

Antibacterial spectrum of silibinin and isomers and its antibacterial effect with antibiotics

XIE Si-lu, ZHAO Mao-ji, YANG Chao-guo

College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: **Objective** To investigate the *in vitro* antibacterial spectrum of silibinin and its isomers and the combined antibacterial effect of silibinin and commonly-used clinical antibiotics. **Methods** Micro-broth dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of silibinin and its isomers against six standard strains and six clinical isolates (74 strains) of common bacteria infections. Plate count method was used to measure the growth inhibition curves of different concentrations of silibinin against six standard strains. Checkerboard micro-broth dilution method was used to carry out the combined susceptibility test of silibinin and clinical antibiotics. The fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated to determine the combined antibacterial effect of silibinin and antibiotics. **Results** The MICs of silibinin against standard strains of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* were between 50 µg/mL and 400 µg/mL, and those of silibinin for standard strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were both greater than 400 µg/mL. The MICs of silibinin for clinical strains, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* were all within the range of 100 µg/mL to 400 µg/mL, and MICs of silibinin against clinical strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were greater than 400 µg/mL. The MICs of other isomers of silibinin against six standard strains were greater than or equal to 400 µg/mL. Silibinin had a significant inhibitory effect on the growth curve of standard strains of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*, which increased with increasing drug concentration, and it had no effect on that of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The FIC of silibinin combined with penicillin/erythromycin for gram-positive test

收稿日期: 2018-09-20

作者简介: 谢思露(1995—), 女, 四川人, 硕士在读, 主要从事微生物学及免疫学检验方面的研究。Tel: 18408257182

*通信作者 杨朝国, 研究生导师, 教授。E-mail: 2641253779@qq.com

bacteria was in the range of $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ and $1 < \text{FIC} \leq 2$, and FIC of silibinin combined with ciprofloxacin or gentamicin for gram-negative test bacteria was in the range of $\text{FIC} > 2$ or $1 < \text{FIC} \leq 2$. **Conclusion** Silibinin has a notable antibacterial activity to gram-positive bacteria with the best inhibitory effect on *Staphylococcus epidermidis*. The antibacterial activities of silibinin is higher than those of other isomers. The combined antibacterial effect of silibinin and penicillin/erythromycin is mainly additive and irrelevant, while that of silibinin and ciprofloxacin or gentamicin is mainly antagonistic or irrelevant.

Key words: silibinin; isomers; minimum inhibitory concentration; bacterial growth curve; combined antibacterial effect

随着抗生素的广泛使用,细菌耐药性给临床抗感染治疗带来严峻挑战,已经成为 21 世纪全球公共卫生面临的重大问题^[1-5]。相比耐药菌的迅速增加,近年来抗菌药物的研发速度明显减慢,未来临床可能会出现无药可用的局面。目前人们已将视线投向天然药物^[6],中草药因其来源广泛、价廉、毒副作用小及不易出现耐药性,而成为新抗菌药物研发的热点^[7-8]。

中药抑菌杀菌的有效成分多样,包括有机酸、挥发油、生物碱、多糖类、黄酮类、萜类、醌类等,从植物花、叶、种子、果实、根、茎中提取的黄酮类化合物具有直接抑菌、协同抑菌及抑制细菌毒性等作用,其抑菌活性与分子结构有关,自然界中不同来源及不同种类的黄酮类化合物分子结构各异,抑菌谱和抑菌活性各不相同^[9-11]。水飞蓟种子皮的初级总提取物水飞蓟素为黄酮本质素类化合物,包括紫杉醇、紫杉醇衍生物、水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾 A、水飞蓟宾 B、异水飞蓟宾 A、异水飞蓟宾 B 和脱氢水飞蓟宾 9 种成分,主要活性成分为水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟亭和水飞蓟宁 4 种同分异构体,其中水飞蓟宾含量最高(60%~70%),并对金黄色葡萄球菌有抑制作用^[12]。中药成分复杂、作用机制广泛,分离纯化得到有效单体并研究其药理作用是现代中药开发应用的基础。目前水飞蓟宾作为保肝药物广泛应用于临床^[13-14]。但关于水飞蓟宾及同分异构体的抑菌谱及其与抗生素联合抑菌效应的报道极少。本实验采用微量肉汤稀释法测定最小抑菌浓度(MIC)和联合药敏实验,探讨水飞蓟宾及同分异构体的抑菌谱及其与临床常用抗生素的联合抑菌效应,为新抗菌药物的开发和研制提供科学依据,为黄酮类药物的进一步开发应用提供基础。

1 材料

1.1 药物与试剂

水飞蓟宾(质量分数>98%,批号 Y-024-150422)、水飞蓟宁(质量分数>98%,批号 S-112-170418)、异水飞蓟宾(质量分数>98%,批号 Y-138-161201)、水飞蓟亭(质量分数>97%,批号 S-111-170418)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司;青霉素、红霉素、庆大霉素和环丙沙星标准物质购自中国食品

药品检定研究院;M-H 肉汤培养基粉末购自青岛高科园海博生物技术有限公司;营养琼脂购自北京奥博星生物技术有限责任公司;Costar®96 孔细胞培养板为美国 Corning-Costar 产品。

1.2 菌株

1.2.1 标准菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC25923、表皮葡萄球菌 ATCC12228、粪肠球菌 ATCC29212、尿肠球菌 ATCC19434、大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853,购自广东省食品微生物安全工程技术研究开发中心-菌种保藏中心。

1.2.2 临床分离菌株 金黄色葡萄球菌 15 株、表皮葡萄球菌 10 株、粪肠球菌 4 株、尿肠球菌 15 株、大肠埃希菌 15 株、铜绿假单胞菌 15 株,均收集于四川省中医院。

1.3 仪器

台式恒温振荡培养器购自上海跃进医疗器械有限公司。

2 方法

2.1 水飞蓟宾及同分异构体药液配制

用二甲基亚砜将水飞蓟宾及同分异构体样品溶解并配成 80 mg/mL 的母液,滤过除菌后 4 °C 保存备用。使用时先用无菌 MH 肉汤将母液稀释 100 倍,再用 MH 肉汤进行倍比稀释为 800、400、200、100、50、25、12.5 µg/mL。

2.2 抗生素溶液配制

用冰醋酸溶解红霉素,用蒸馏水溶解青霉素、环丙沙星、庆大霉素,配成 800 µg/mL 母液,滤过除菌后 4 °C 保存备用,使用时用无菌 MH 肉汤倍比稀释。

2.3 细菌悬液制备

将菌株复苏于血琼脂平板上,37 °C 培养 24~48 h,挑取单个纯菌落接种于无菌 MH 肉汤培养基中,37 °C (100 r/min) 振摇培养至对数生长期,用无菌 MH 肉汤稀释菌悬液至 0.5 麦氏浊度(1.5×10^8 CFU/mL),再用 MH 肉汤调节菌液浓度为 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ CFU/mL。

2.4 MIC 测定

采用美国临床和实验室标准协会(Clinical and

Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法测定各受试样品的 MIC。

2.4.1 水飞蓟宾及同分异构体对标准菌株的 MIC 测定 取 96 孔板, 每孔加入 100 μL 菌悬液和 100 μL 不同质量浓度的供试药液 (水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟亭和水飞蓟宁), 使药物终质量浓度分别为 400、200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ (100 r/min) 振荡培养 18~24 h, 以肉眼观察无细菌生长、培养液清澈的最低药物质量浓度为 MIC。同时设阴性对照 (无菌 MH 肉汤) 和阳性对照 (细菌+无菌 MH 肉汤)。实验重复 3 次, 取平均值。

2.4.2 水飞蓟宾对临床分离菌株的 MIC 测定 按“2.4.1”项方法操作测定。

2.4.3 抗生素对标准菌株和临床分离菌株的 MIC 测定 革兰阳性菌 (金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌) 选用青霉素、红霉素, 革兰阴性菌 (大肠埃希菌、铜绿假单胞菌) 选用庆大霉素、环丙沙星。按“2.4.1”项方法操作测定。

2.5 水飞蓟宾对标准菌株的生长抑制曲线检测

取 96 孔板, 每孔加入 100 μL 菌悬液和 100 μL 不同质量浓度的水飞蓟宾药液, 使水飞蓟宾终质量浓度分别为 0.5 MIC、1 MIC、2 MIC; 菌阳性对照组用无菌 MH 肉汤替代药液 (菌悬液+无菌 MH 肉汤)。放 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中培养, 分别于培养 0、2、4、6、8、10、12、14、16 h 取样进行平板菌落计数 (按国标 GB/T 5750.12-2006)。将菌悬液按 10 倍递增稀释后, 取目标浓度菌悬液 1 mL 加入一次性无菌平皿, 再加入 15 mL 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右营养琼脂, 立即混匀, 待凝固后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h, 肉眼观察并记录每个平皿的菌落形成单位 (colony forming unit, CFU)。以菌落数为 30~300 的平板, 计算每毫升原始样品中所含细菌总数 (1 mL 原菌悬液中的活菌数=全平板 CFU $\times$ 稀释倍数), 每个浓度菌液同时做 3 个平行平板, CFU 取 3 个平板的均值。当空白对照 (只加无菌 MH 肉汤+营养琼脂, 不加菌悬液) 平板上无细菌生长时, 实验结果有效。以菌落总数为纵坐标, 培养时间为横坐标绘制生长抑制曲线。

2.6 水飞蓟宾与抗生素对标准菌株和临床分离菌株的联合药敏实验^[15]

采用棋盘法。将水飞蓟宾及临床常用抗生素溶液 (革兰阳性菌选用青霉素和红霉素, 革兰阴性菌选用庆大霉素和环丙沙星) 以 MH 肉汤倍比稀释成 8 个质量浓度, 即 4 MIC、2 MIC、1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、

1/8 MIC、1/16 MIC、1/32 MIC。联合药物孔将不同质量浓度的水飞蓟宾药液与抗生素溶液两两组合加入 96 孔板, 每种药液每孔各加 50 μL ; 抗生素或水飞蓟宾单药孔加相应单一药液每孔 100 μL ; 细菌生长阳性对照每孔加无菌 MH 肉汤 100 μL 。再向每孔加入 100 μL 菌悬液, 振荡混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。记录抗生素单用 MIC (MIC_{甲药单用})、水飞蓟宾单用 (MIC_{乙药单用}) 和抗生素与水飞蓟宾联合应用 MIC (MIC_{甲药联用}和 MIC_{乙药联用})。计算联合抑菌指数 (fractional inhibitory concentration, FIC) = MIC_{甲药联用}/MIC_{甲药单用} + MIC_{乙药联用}/MIC_{乙药单用}。实验重复 3 次, 取平均值。联合抑菌效应判定: FIC $\leq$ 0.5, 2 种药物有协同作用; 0.5<FIC $\leq$ 1, 2 种药物有相加作用; 1<FIC $\leq$ 2, 2 种药物为无关作用; FIC>2, 2 种药物有拮抗作用。

2.7 数据统计学分析

统计学处理采用 SPSS 23.0 统计软件, 计数资料以百分比表示。菌种间 MIC 值分布的总体比较采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验, 两两比较采用单因素方差分析。FIC 值分布的比较采用独立样本 χ^2 检验, 两两比较采用 χ^2 分割法。

3 结果

3.1 水飞蓟宾及同分异构体对标准菌株的 MIC

结果见表 1。水飞蓟宾对革兰阳性菌标准菌株的 MIC 为 50~400 $\mu\text{g/mL}$, 对表皮葡萄球菌表现出最强的抑菌活性, MIC 值为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。水飞蓟宾对革兰阴性菌标准菌株的抑菌效果明显低于革兰阳性菌, MIC 值>400 $\mu\text{g/mL}$; 在水飞蓟宾的同分异构体中, 仅异水飞蓟宾表现出对表皮葡萄球菌、屎肠球菌和粪肠球菌标准菌株有一定的抑菌活性 (MIC 为 400 $\mu\text{g/mL}$)。水飞蓟宾的抑菌活性明显高于其同分异构体。

3.2 水飞蓟宾对临床分离菌株的 MIC

结果见表 2。水飞蓟宾对表皮葡萄球菌临床分离菌株的 MIC 值分布为>400、400、200、100 $\mu\text{g/mL}$, 对应菌株占比分别为 20.0%、40.0%、20.0%、20.0%; 对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和屎肠球菌临床分离菌株的 MIC 值分布为>400、400 $\mu\text{g/mL}$; 对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌临床分离菌株的 MIC 值均>400 $\mu\text{g/mL}$ 。表皮葡萄球菌的 MIC 值分布与其他测试菌种比较, 差异显著 ($P<0.05$)。

3.3 抗生素对标准菌株和临床分离菌株的 MIC

结果见表 3 和 4。临床常用抗生素对标准菌株的 MIC 值符合 CLSI 对非苛养菌的 MIC 质量控制允许范围。

表 1 水飞蓟宾及同分异构体对标准菌株的 MIC

Table 1 MICs of silibinin and isomers against standard strains

药物	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	表皮葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	屎肠球菌	粪肠球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌
水飞蓟宾	50	400	400	400	>400	>400
异水飞蓟宾	400	>400	400	400	>400	>400
水飞蓟宁	>400	>400	>400	>400	>400	>400
水飞蓟亭	>400	>400	>400	>400	>400	>400

表 2 水飞蓟宾对临床分离菌株的 MIC 值分布

Table 2 Distribution of MICs of silibinin against clinical isolates

菌种	总株数	MIC>400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		MIC=400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		MIC=200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		MIC=100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
		数量	占比/%	数量	占比/%	数量	占比/%	数量	占比/%
表皮葡萄球菌*	10	2	20.0	4	40.0	2	20.0	2	20.0
金黄色葡萄球菌	15	9	60.0	6	40.0	0	0	0	0
粪肠球菌	4	3	75.0	1	25.0	0	0	0	0
屎肠球菌	15	8	53.3	7	46.7	0	0	0	0
大肠埃希菌	15	15	100.0	0	0	0	0	0	0
铜绿假单胞菌	15	15	100.0	0	0	0	0	0	0

与其他菌种 MIC 值分布比较: * $P<0.05$ * $P<0.05$ vs distribution of MICs of other strains

表 3 抗生素对标准菌株的 MIC

Table 3 MICs of antibiotics against standard strains

药物	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	表皮葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	屎肠球菌	粪肠球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌
青霉素	1.250	0.625	3.125	3.125	—	—
红霉素	0.313	0.313	2.500	2.500	—	—
环丙沙星	—	—	—	—	0.005	0.400
庆大霉素	—	—	—	—	0.625	0.625

表 4 抗生素对临床分离菌株的 MIC

Table 4 MICs of antibiotics against clinical isolates

菌种	青霉素		红霉素		菌种	环丙沙星		庆大霉素	
	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	株数	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	株数		MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	株数	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	株数
表皮葡萄球菌	0.019 5	1	0.156	1	大肠埃希菌	0.156	9	0.625	9
	0.156 0	1	10.000	6		1.250	1	20.000	6
	1.250 0	4	20.000	3		5.000	5		
	2.500 0	4			铜绿假单胞菌	0.156	10	0.625	10
金黄色葡萄球菌	0.078 1	1	0.156	5		0.625	1	2.500	4
	0.500 0	1	10.000	10		2.500	2	5.000	1
	0.625 0	2				5.000	2		
	1.250 0	11							
粪肠球菌	1.250 0	1	2.500	1					
	40.000 0	3	10.000	3					
屎肠球菌	40.000 0	2	0.156	1					
	80.000 0	13	10.000	14					

3.4 水飞蓟宾对标准菌株的生长抑制曲线检测结果

结果见图 1。对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和屎肠球菌，培养液中水飞蓟宾浓度为 0.5 MIC 时菌体繁殖速度减慢；当药物浓度为 1

MIC 或 2 MIC 时菌体繁殖速度受到明显抑制，在培养的 16 h 内菌体浓度与初始浓度相比基本无变化。大肠埃希菌和铜绿假单胞菌生长曲线不受水飞蓟宾影响，在培养的 16 h 内与对照组的菌体数量及繁殖速度基本一致。

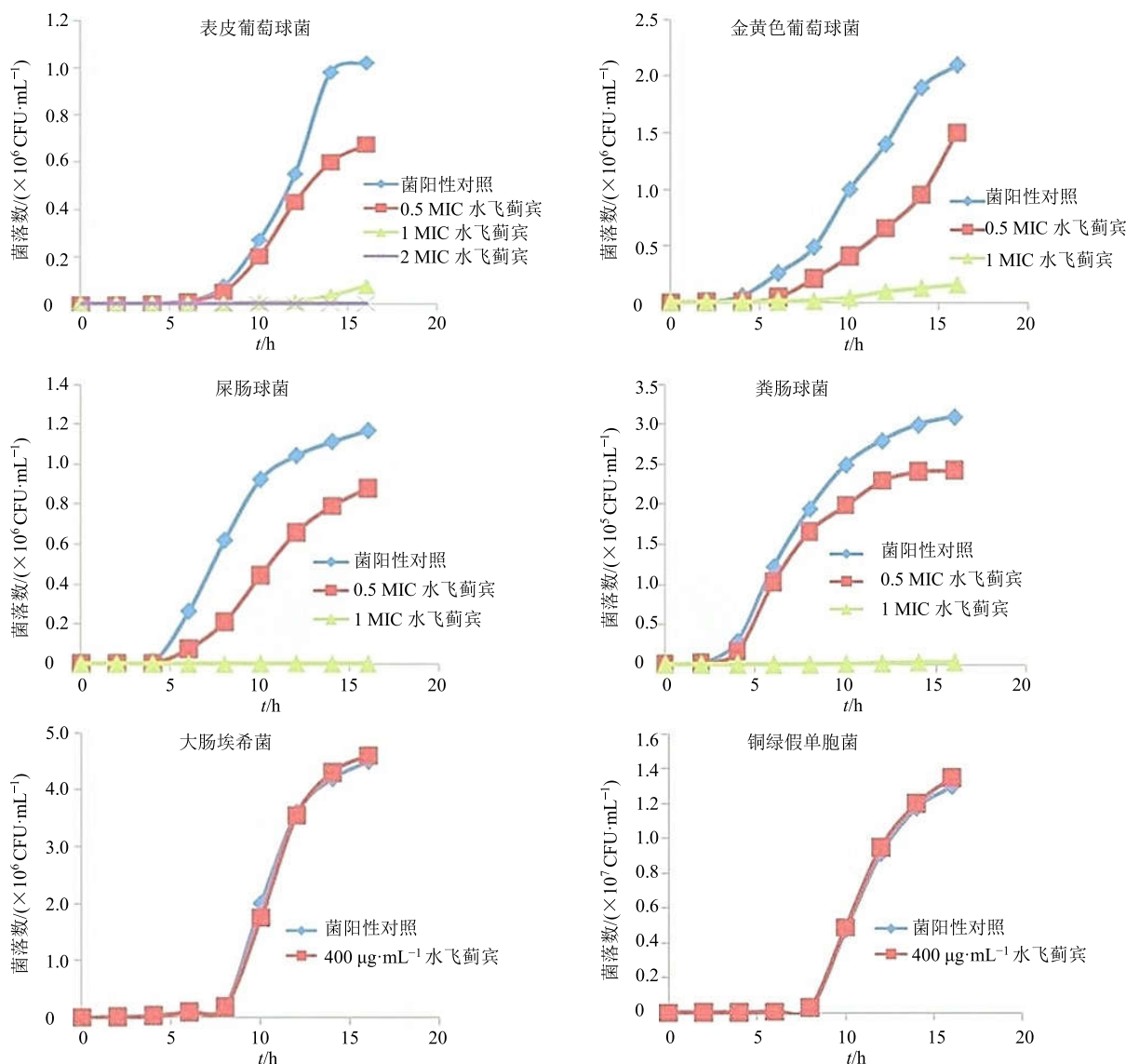


图 1 不同质量浓度水飞蓟宾对临床感染常见细菌标准菌株的生长抑制曲线

Fig. 1 Growth inhibition curve of different concentrations of silibinin on common bacterial strains of clinical infection

3.5 水飞蓟宾与临床常用抗生素对标准菌株的联合抑菌效应

FIC 值结果见表 5。水飞蓟宾与青霉素联合，对表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌有相加作用，对屎肠球菌和粪肠球菌是无关作用。水飞蓟宾与红霉素联合，对表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌分别为协同和相加作用，对屎肠球菌和粪肠球菌是无关作用。水飞蓟宾与环丙沙星联合，对大肠埃希菌和铜

绿假单胞菌均为拮抗作用。水飞蓟宾与庆大霉素联合，对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌均为无关作用。

3.6 水飞蓟宾与临床常用抗生素对临床分离菌株的联合抑菌效应

FIC 值结果见表 6 和 7。水飞蓟宾与青霉素联合，对表皮葡萄球菌和粪肠球菌的 FIC 值分布差异显著 ($P < 0.01$)，对表皮葡萄球菌主要是相加作用，对粪肠球菌主要是无关作用；菌株间 FIC 值分布的

表5 水飞蓟宾联合抗生素对标准菌株的联合抑菌指数

Table 5 Fractional inhibitory concentration of silibinin combined with clinical antibiotics against standard strains

药物	FIC					
	表皮葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	屎肠球菌	粪肠球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌
水飞蓟宾+青霉素	0.75	0.75	1.5	1.5	—	—
水飞蓟宾+红霉素	0.075	1	1.5	1.5	—	—
水飞蓟宾+环丙沙星	—	—	—	—	FIC>2	FIC>2
水飞蓟宾+庆大霉素	—	—	—	—	1<FIC<2	1<FIC<2

表6 水飞蓟宾联合抗生素对临床分离革兰阳性菌株的 FIC 值分布

Table 6 Distribution of FIC values of silibinin combined with clinical antibiotics against clinical gram-positive isolates

菌种	总株数	水飞蓟宾+青霉素				水飞蓟宾+红霉素			
		0.5<FIC≤1		1<FIC≤2		0.5<FIC≤1		1<FIC≤2	
		数量	占比/%	数量	占比/%	数量	占比/%	数量	占比/%
表皮葡萄球菌	10	8	80.0	2	20.0	7	70.0	3	30.0
金黄色葡萄球菌	15	8	53.3	7	46.7	5	33.3	10	66.7
屎肠球菌	4	0	0	4	100.0	1	25.0	3	75.0
粪肠球菌	15	3**	20.0	12**	80.0	2	13.3	13	86.7
合计	44	19	43.2	25	56.8	15	34.1	29	65.9

与表皮葡萄球菌 FIC 值分布比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs distribution of FIC values of *Staphylococcus epidermidis*

表7 水飞蓟宾联合抗生素对临床分离革兰阴性菌株的 FIC 值分布

Table 7 Distribution of FIC values of silibinin combined with clinical antibiotics against clinical gram-negative isolates

菌种	总株数	水飞蓟宾+环丙沙星				水飞蓟宾+庆大霉素			
		1<FIC≤2		FIC>2		1<FIC≤2		FIC>2	
		数量	占比/%	数量	占比/%	数量	占比/%	数量	占比/%
大肠埃希菌	15	2	13.3	13	86.7	12 [△]	80.0	3 [△]	20.0
铜绿假单胞菌	15	4	26.7	11	73.3	14 [△]	93.3	1 [△]	6.7
合计	30	6	20.0	24	80.0	26	86.7	4	13.3

与水飞蓟宾+环丙沙星对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的 FIC 值分布比较: [△] $P<0.05$ [△] $P<0.05$ vs distribution of FIC values of silibinin + ciprofloxacin against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

其余两两比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。水飞蓟宾与红霉素联合, 对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌及屎肠球菌的 FIC 值分布差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。水飞蓟宾与环丙沙星联合, 对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的 FIC 值分布差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 水飞蓟宾与庆大霉素联合, 对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的 FIC 值分布差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

水飞蓟宾与青霉素联合对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、屎肠球菌和粪肠球菌的 FIC 值分布, 与水飞蓟宾与红霉素联合对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、屎肠球菌和粪肠球菌的 FIC 值分布比较,

差异无统计学意义 ($P>0.05$)。水飞蓟宾与环丙沙星联合对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的 FIC 值分布, 与水飞蓟宾与庆大霉素联合对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的 FIC 值分布比较, 差异显著 ($P<0.05$), 水飞蓟宾与环丙沙星联合对这 2 种细菌的联合抑菌效应均以拮抗为主, 水飞蓟宾与庆大霉素联合对这 2 种细菌的联合抑菌效应均以无关为主。

4 讨论

抗生素滥用, 在医疗、食品安全、动物养殖和环境等方面引起的问题日趋严重。寻找并应用其他抗菌物质控制耐药性细菌或用于食品防腐逐渐引起关注。从天然植物中寻找抗菌资源, 筛选抗菌药物越

来越受到国内外学者的重视^[16]。近年来水飞蓟素的抗菌活性逐渐引起了人们的关注^[17-21]，但大多数研究是关于水飞蓟素混合物，而对单体的抑菌活性、抑菌谱及其与抗生素联合抑菌效应报道极少。

本实验结果显示，水飞蓟宾对临床常见感染细菌的抑菌活性明显高于其他同分异构体（异水飞蓟宾、水飞蓟亭和水飞蓟宁），表明水飞蓟宾为水飞蓟素的主要抑菌活性成分。黄酮类化合物的抑菌活性具有构效关系，分子中的电荷密度、A环羟基化与亲脂性取代基团能增强抑菌活性，分子结构中较多酚羟基，可与蛋白质、酶等以氢键结合而使其失去活性，从而起到抑菌的作用^[6,11]。水飞蓟宾对革兰阳性试验菌的抑菌活性显著高于革兰阴性试验菌，这可能与细胞壁结构差异有关，水飞蓟素（宾）可破坏革兰阳性菌-金黄色葡萄球菌和粪肠球菌的细胞壁^[12,18]。水飞蓟宾对表皮葡萄球菌的抑菌活性最强，标准菌株和临床分离菌株的 MIC 值分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100~400 $\mu\text{g/mL}$ ；对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、尿肠球菌的抑菌效果不佳，这些标准菌株和临床分离菌株的 MIC 值分别为 400 $\mu\text{g/mL}$ 和 $\geq 400 \mu\text{g/mL}$ 。Evren 等^[19]报道水飞蓟素对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、耐万古霉素肠球菌和粪肠球菌的 MIC 值为 60~120 $\mu\text{g/mL}$ ，水飞蓟宾占水飞蓟素的 60%~70%，据此可推出水飞蓟宾对这些细菌的 MIC 值应低于 60~120 $\mu\text{g/mL}$ 。水飞蓟宾单体对这些细菌的 MIC 值明显高于水飞蓟素，这可能与水飞蓟素为含多种成分的混合物，存在协同抑菌作用及药物纯度有关。文献报道^[6]甘草乙醇浸膏中甘草酸和甘草渣总黄酮具有协同抑菌作用。鉴于上述结果，本实验选用抑菌活性最好的水飞蓟宾进行后续实验。

本实验结果显示，水飞蓟宾对多重耐药菌的抑菌活性明显低于敏感菌株。这与 Jung 等^[20]的研究结果存在较大差异。与标准菌株比较，水飞蓟宾对临床分离菌株显示较低的抑菌活性，在相同菌种临床分离菌株间 MIC 也存在较大差异，这可能主要是因为菌株间存在不同耐药机制，如细菌同时产生多种抗生素水解酶、钝化酶、修饰酶，或存在外排泵系统，或药物作用靶位改变等，这些都可使药物的抑菌作用降低。

本实验结果表明，水飞蓟宾对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和尿肠球菌的生长都有明显抑制作用，抑制效果随药物质量浓度的增加而

增加。水飞蓟宾对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的生长没有抑制作用。这也验证了水飞蓟宾能抑制革兰阳性菌生长，而对革兰阴性菌生长无抑制作用。

临床上中西药联合应用较为广泛，中药和化学药联合应用可取长补短利于疾病治疗、减少耐药菌发生、降低或减少毒副作用。联合药敏实验结果表明，对革兰阳性试验菌，水飞蓟宾与青霉素/红霉素联合抑菌效应以相加和无关作用为主，无协同和拮抗作用。水飞蓟宾与青霉素/红霉素联合用药，对青霉素/红霉素耐药的菌株，不能降低细菌对青霉素/红霉素的耐药程度和使其耐药性逆转；但对青霉素/红霉素敏感的菌株，可降低青霉素/红霉素的临床用药剂量，降低或减少毒副作用与不良反应。对革兰阴性试验菌，水飞蓟宾与环丙沙星联合抑菌效应以拮抗作用为主，无协同和相加作用。水飞蓟宾与环丙沙星联合用药，不仅不能降低环丙沙星耐药菌株对环丙沙星的抗药性，反而增加其抗药性；对环丙沙星敏感菌株，需增加环丙沙星的临床用药剂量，更易引起毒副作用或不良反应。水飞蓟宾与庆大霉素联合抑菌效应以无关作用为主，少数可产生拮抗作用，无协同和相加作用。水飞蓟宾与庆大霉素联合用药，不能降低庆大霉素耐药菌株的耐药程度和使其耐药性逆转，有可能增强其抗药性；对庆大霉素敏感菌株，不能降低庆大霉素的临床用药剂量，致水飞蓟宾的无意义用药。但水飞蓟宾可减少庆大霉素产生的活性氧，减轻其引起的肾脏毒性^[22]。

参考文献

- [1] 杜 鹏, 谢 峻, 郑颖城. 《抗生素耐药: 全球监测报告 2014》解读与反思 [J]. 华南国防医学杂志, 2014, 28(8): 814-817.
- [2] 冯晶晶, 王小万, 崔月颖. 欧洲促进新抗菌药物研发的措施及经验 [J]. 中国药房, 2014, 25(1): 7-9.
- [3] 李 耘, 吕 媛, 薛 峰, 等. 卫生部全国细菌耐药监测网 (Mohnarín) 2011—2012 年革兰阳性菌耐药监测报告 [J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(3): 251-259.
- [4] 李 耘, 吕 媛, 薛 峰, 等. 卫生部全国细菌耐药监测网 (Mohnarín) 2011—2012 年革兰阴性菌耐药监测报告 [J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(3): 260-277.
- [5] 王 启, 季 萍, 徐修礼, 等. 2016 年中国 14 家教学医院革兰阴性杆菌耐药监测分析 [J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(8): 614-622.
- [6] 靳 蕊, 徐敏纹, 刘 莹, 等. 黄酮类化合物的抑菌作用及其机制的研究 [J]. 继续医学教育, 2016, 30(8): 152-154.

- [7] Alvarez-Ordonez A, Carvajal A, Arguello H, *et al.* Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract [J]. *J Appl Microbiol*, 2013, 115(1): 50-60.
- [8] 李娟, 张学顺, 傅春升, 等. 中药抗菌作用的研究进展 [J]. 中国药业, 2014, 23(2): 90-93.
- [9] 刘一杰, 薛永常. 植物黄酮类化合物的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(9): 81-86.
- [10] 李亚娜, 陶庆春. 中药抑菌的研究现状及思考 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2): 198-200.
- [11] 游庭活, 刘凡, 温露, 等. 黄酮类化合物抑菌作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3645-3650.
- [12] 杜文静, 谢亚斌, 葛雅琨, 等. 水飞蓟宾对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的体外抑菌作用的研究 [J]. 吉林化工学院学报, 2016, 33(7): 66-69.
- [13] Shukla S K, Dasgupta A, Mehla K, *et al.* Silibinin-mediated metabolic reprogramming attenuates pancreatic cancer-induced cachexia and tumor growth [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(38): 41146-41161.
- [14] Bahmani M, Shirzad H, Rafieian S, *et al.* *Silybum marianum*: Beyond hepatoprotection [J]. *J Evid Based Compl Altern Med*, 2015, 20(4): 292-301.
- [15] Wang Z, Zhang L, Wang J, *et al.* Synergistic interaction of PMAP-36 and PRW4 with aminoglycoside antibiotics and their antibacterial mechanism [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(12): 3121-3128.
- [16] 彭齐, 谢丽玲, 谢俊. 中药抑菌机制的研究方法 [J]. 生物技术进展, 2015, 5(1): 66-69.
- [17] Lee D G, Kim H K, Park Y, *et al.* Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum* [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(8): 597-600.
- [18] 曾伟民, 陶超, 范晓旭, 等. 水飞蓟籽秆中水飞蓟素成分分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, 7(13): 168-170.
- [19] Evren E, Yurtcu E. *In vitro* effects on biofilm viability and antibacterial and antiadherent activities of silymarin [J]. *Folia Microbiol*, 2015, 60(4): 351-356.
- [20] Jung H J, Lee D G. Synergistic antibacterial effect between silybin and *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates [J]. *J Microbiol*, 2008, 46(4): 462-467.
- [21] 袁琳慧, 王迪, 谢鲲鹏, 等. 穿心莲和水飞蓟抑制 MRSA41577 外排系统的作用机制 [J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(11): 27-29.
- [22] 金戈, 王俊平, 王春红, 等. 水飞蓟宾减轻庆大霉素肾毒性作用的研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 51-53.