

文章编号: 1001-8689(2018)06-0765-07

## 四季青水煎液体外抗内毒素、抗菌和体内抗炎作用

程强<sup>1</sup> 周杨杨<sup>1</sup> 唐炯<sup>2\*</sup> 孙文霞<sup>1</sup> 刘昆<sup>1</sup> 鲁兰<sup>1</sup>

(1 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 四川抗菌素工业研究所, 成都大学, 成都 610052; 2 四川省第二中医医院, 成都 610031)

**摘要:** **目的** 研究四季青水煎液的抗内毒素、抗菌和抗炎作用, 揭示四季青清热解毒作用的药效学特点。**方法** 采用体外鲎试剂凝集实验方法检测其抗内毒素作用; 采用琼脂二倍稀释法测定四季青水煎液以及与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时对25株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBLs)大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC); 采用二甲苯致小鼠耳廓炎症肿胀法观察其抗炎作用。**结果** 四季青水煎液在生药浓度6.25~100mg/mL时具有抗内毒素作用; 对受试菌株MSSA、MRSA的MIC范围均为8~33mg/mL, 对产ESBLs大肠埃希菌及非产ESBLs大肠埃希菌的MIC范围均为33~133mg/mL, 对铜绿假单胞菌的MIC为33~133mg/mL; 与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时抗菌活性有相加作用, 分级抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数范围为0.5<FIC $\leq$ 1; 在小鼠口服给药剂量1,280~2,000mg/kg时对小鼠耳肿胀具有抗炎作用。**结论** 四季青水煎液具有较强的抗内毒素作用和一定的抗炎作用, 对MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌均具有一定的抗菌活性; 与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时抗菌活性具有相加作用; 其清热解毒功能主要以清热作用为主。

**关键词:** 四季青; 水煎液; 抗内毒素; 抗菌; 抗炎; 清热解毒; 体外; 小鼠

中图分类号: R978.1

文献标志码: A

## The anti-endotoxin, antibacterial effects *in vitro* and anti-inflammatory effects *in vivo* of *Ilicis chinensis* folium water decoction

Cheng Qiang<sup>1</sup>, Zhou Yang-yang<sup>1</sup>, Tang Jiong<sup>2</sup>, Sun Wen-xia<sup>1</sup>, Liu Kun<sup>1</sup> and Lu Lan<sup>1</sup>

(1 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotic, Chengdu University, Chengdu 610052; 2 Sichuan Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610031)

**Abstract Objective** To investigate the anti-endotoxin, antibacterial and anti-inflammatory effects of *Ilicis chinensis* folium water decoction (ICFWD) and reveal the pharmacological properties of the clearing-heat and detoxifying effects of *Ilicis chinensis* folium. **Methods** The anti-endotoxin effect of ICFWD *in vitro* was tested using the limulus agglutination assay. Antibacterial effect for the combination of ICFWD *in vitro* with cefotaxime, levofloxacin and gentamicin against 25 strains including methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-producing *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) were also investigated by the agar 2-fold dilution assay. The anti-inflammatory effect of ICFWD was observed by an xylene-induced auricle inflammation model in mice. **Results** ICFWD showed anti-endotoxin effects at doses ranging from 6.25 to 100mg/mL. The minimum inhibitory concentration of ICFWD against MSSA and MRSA, ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-

收稿日期: 2017-06-06

基金项目: 四川省科技厅计划项目(No. 2016JY0077)

作者简介: 程强, 男, 生于1963年, 研究员, 主要从事药动学方向研究, E-mail: chengyaodai@163.com

\*通讯作者, E-mail: jackjiong@163.com

producing *Escherichia coli*, as well as *P. aeruginosa* were 8~33mg/mL, 33~>133mg/mL and 33~133mg/mL, respectively. The combined treatment of ICFWD with cefotaxime, levofloxacin and gentamicin showed additive effects, the fractional inhibitory concentration (FIC) index were  $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ . When orally administrated in mices, ICFWD showed anti-inflammatory effects at doses ranging from 1,280 to 2000mg/kg. **Conclusion** ICFWD exhibited potent anti-endotoxin effects and some anti-inflammatory effects. ICFWD had some antibacterial effects against MSSA, MRSA, ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-producing *Escherichia coli*, and *P. aeruginosa*. The combined treatment of ICFWD with cefotaxime, levofloxacin and gentamicin showed additive effects. It was indicated that the clearing-heat effect acted as the principal action in pharmacological properties of clearing-heat and detoxifying effects of ICFWD.

**Key words** *Ilicis chinensis* folium water decoction(ICFWD); Anti-endotoxin; Antibacteria; Anti-inflammation; Clearing-heat and detoxifying effects; *In vitro*; Mice

细菌耐药性问题对人类的威胁越来越大,新的抗菌药物被发现的速度已经不能跟上细菌耐药性产生的步伐,新型抗生素的发现越来越困难<sup>[1]</sup>。中药是中华民族之瑰宝,用中药进行抗感染治疗具有悠久的历史,中药的特点是多组分、多靶点、药理作用广泛,具有抗菌活性的中药能以多种途径抑制或杀灭细菌,细菌很难有同时针对多种活性成分的突变菌株,因而不产生耐药性<sup>[2-3]</sup>。与西药相比,中药属于由食物衍化而来的自然产物,药食同源,药食相兼,人体对其适应性较强、毒副反应较小<sup>[4]</sup>。从中药(天然产物)中寻找高效低毒、具有抗菌活性的物质可能是应对细菌耐药性问题的一种新的思路的重要途径<sup>[5]</sup>。

四季青(*Ilicis chinensis* folium)为冬青科植物冬青(*Ilex chinensis* Sims)的干燥叶,《中国药典》2015版收载品种,其产地分布广泛,价格低廉,具有清热解毒、凉血止血等功效,临床上常应用于肺热咳嗽、咽喉肿痛、热淋、泻痢和水火烫伤等证候治疗<sup>[6-7]</sup>。现代植物化学研究结果表明,四季青的化学成分以酚酸类化合物和三萜类化合物为主,包含有黄酮类、甾体、挥发油、鞣质和胡萝卜苷等<sup>[8]</sup>,同时,现代药理研究也证实四季青具有抗菌、抗炎等广泛的药理作用<sup>[9]</sup>。目前文献报道的有关四季青的抗菌作用研究较为有限,且多采用标准菌株进行测试,代表性不强,对抗炎作用的研究多为外用,对四季青的抗内毒素研究则未见报道。本文对四季青水煎液的抗内毒素、抗菌和抗炎作用进行了研究,发现四季青水煎液体外具有较强的抗内毒素作用和一定的抗菌和抗炎作用,具有进一步研究的价值。

## 1 四季青水煎液的主要化学成分含量测定

### 1.1 材料与仪器

原儿茶酸对照品(批号: Z30M6L1, 上海原叶生物科技有限公司, 20mg, HPLC $\geq$ 98%), 槲皮素对照品(批号: Y26D5Y1, 上海原叶生物科技有限公司,

20mg, HPLC $\geq$ 98%), 绿原酸对照品(批号: R05F6F1, 上海原叶生物科技有限公司, 20mg, HPLC $\geq$ 98%), 甲醇(Fisher Scientific, 色谱纯), 冰乙酸(成都市科龙化工试剂厂, 分析纯), 蒸馏水(自制), 四季青干燥叶(购自亳州市君源堂药材站, 广西、安徽、河南及河北产地)。LC-10A型高效液相色谱仪(日本岛津公司), N2000色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司), AT-330柱温箱(天津奥特赛恩斯仪器有限公司), 色谱柱为Hypersil BDS-C<sub>18</sub>(200mm $\times$ 4.6mm, 5 $\mu$ m, 依利特), 台式高速离心机(TGL-16B, 上海安亭科学仪器厂), 电子天平(CPA225D, 赛多利斯科学仪器有限公司), 旋涡混合器(XW-80, 上海青浦沪西仪器厂), 低温冰箱(日本索尼公司)。

### 1.2 方法

四季青在中国分布广泛, 主要分布在长江以南地区, 本次选择具有代表性、从南向北地域的广西、安徽、河南及河北产地的药材进行试验。

色谱条件: (1)槲皮素, 流动相为甲醇-0.1%冰醋酸水(45:55), 检测波长254nm; (2)原儿茶酸, 流动相为甲醇-0.1%冰醋酸水(15:85), 检测波长260nm; (3)绿原酸, 流动相为乙腈-水(0.2%三乙胺, 磷酸调pH至2.8)(10:90), 检测波长280nm。槲皮素、原儿茶酸和绿原酸均柱温30 $^{\circ}$ C, 流速1mL/min。

槲皮素、原儿茶酸和绿原酸对照品溶液配制: 精密称取槲皮素、原儿茶酸或绿原酸对照品约5.0mg, 置于5mL容量瓶中, 加各流动相配制成浓度为1mg/mL的溶液, 作为对照品储备液, 用前稀释25倍至0.04mg/mL。

四季青水煎液制备: 分别称取4个产地四季青干燥叶50g, 用洁净纱布包好, 放入煎锅中加入1000mL蒸馏水, 浸泡0.5h后煎煮。先用武火煮沸, 后调至文火煎煮1h; 将药液倒入干净烧杯中, 残渣再加入1200mL蒸馏水, 再次煎煮1h后倒出, 合并两次煎煮液, 继续用文火浓缩致25mL, 得不同产地四季青水

煎液<sup>[10-11]</sup>，其生药浓度为2,000mg/mL，现配现用。

槲皮素、原儿茶酸和绿原酸含量测定：槲皮素、原儿茶酸和绿原酸分别按各自的色谱条件，取相应的对照品溶液，进样10μL；四季青水煎液用蒸馏水稀释25倍，进样10μL。

1.3 结果

槲皮素、绿原酸的线性范围为5~100μg/mL，*R*<sup>2</sup>分别为0.9992和0.9998，原儿茶酸的线性范围为3.125~100μg/mL，*R*<sup>2</sup>为0.9997；槲皮素、原儿茶酸、绿原酸的保留时间分别为10.9~11.1、5.7~5.8和11.3~11.6min。

采用外标法计算得到4个产地四季青干燥叶中槲皮素含量为0.008%~0.015%，安徽产最高；原儿茶酸含量为0.017%~0.489%，河北产最高；绿原酸含量为0.056%~0.340%，河北产最高；以河北产四季青干燥叶中槲皮素、原儿茶酸和绿原酸含量总体较高(表1)。

表1 4个产地四季青叶水煎液中主要化学成分含量(%)  
Tab. 1 The concentration of the principal chemical components in *Ilicis chinensis* folium water decoction from four different areas (%)

主要成分	广西	安徽	河南	河北
槲皮素	0.008	0.015	0.011	0.013
原儿茶酸	0.176	0.344	0.017	0.489
绿原酸	0.056	0.262	0.093	0.340

2 四季青水煎液体外抗内毒素作用

2.1 材料与仪器

四季青水煎液(同“1.2”项)，冻干大肠埃希菌内毒素标准品(批号：1612010，湛江安度斯生物有限公司，10EU/支)，鲎试剂(批号：1702131，湛江安度斯生物有限公司，0.1mL/支，0.5EU/mL)，细菌内毒素检查用水(批号：1701190，湛江安度斯生物有限公司，5mL/支)。灭菌锅(LDZX-75KB，上海申安医疗器械厂)，生物安全柜(HFsafe 1200/C，Class II，Type A/B3，力康发展有限公司)，低速离心机(1500型，湘江仪器厂)，电热恒温水浴锅(北京市医疗设备厂)，移液枪(100~1000μL)，无热原一次性注射器(常州悦康医疗器械有限公司，批号：160914，1mL；批号：160808，5mL)。

2.2 方法

前处理及样品准备：将玻璃制品用洗液浸泡一夜，取出后蒸馏水洗净，250℃干热灭菌1h备用；取4个产地2000mg/mL四季青水煎液用无菌水稀释，分别配制得到浓度100、50、25、12.5、6.25和3.13mg/mL受试溶液，现配现用。

鲎试剂灵敏度按《中国药典》2015年版四部方

法复核，测定值符合规定后可用于实验。将内毒素标准品用1mL内毒素检查用水溶解，得到10EU/mL的溶液，涡旋混合3min，取0.3mL加入2.7mL内毒素检查用水中，涡旋混合1min，得到1EU/mL的内毒素溶液，备用。取此1EU/mL的内毒素溶液0.1mL分别加入到0.1mL的各浓度四季青水煎液中，摇匀，37℃水浴30min，冷却至室温后取0.1mL加入至含0.1mL鲎试剂白色透明小瓶中，盖好瓶盖，摇匀，做为受试组。另取0.1mL内毒素溶液，直接加入到含0.1mL鲎试剂小瓶中，做为阳性对照；取内毒素检查用水0.1mL，加入到含0.1mL鲎试剂小瓶中做为阴性对照。受试组与阳性对照组和阴性对照组同时于(37±1)℃水浴温孵(60±1)min，小心从水浴锅中取出，缓缓倒转180°观察，若管内凝胶不变形，不从管壁滑脱者视为产生凝集的阳性反应，无拮抗内毒素作用，计为“+”；若管内凝胶变形，不能保持完整而从管壁滑脱者视为不产生凝集的阴性反应，有拮抗内毒素作用，计为“-”。在拿取过程中应避免剧烈振动，防止出现假阴性结果，结果可信的前提必须满足阳性对照管形成坚实凝胶和阴性对照管仍为流动性液体<sup>[12]</sup>。

2.3 结果

4个产地四季青水煎液在浓度25~100mg/mL时均具有较强的拮抗内毒素作用，最低能抑制内毒素的浓度为6.25~25mg/mL，其中以安徽产四季青最强，河北产四季青次之(表2)。

3 四季青水煎液体外抑菌作用

3.1 4个产地四季青水煎液体外抑菌作用

3.1.1 材料与仪器

质控菌株：金黄色葡萄球菌ATCC29213、大肠埃希菌ATCC25922、铜绿假单胞菌ATCC27853购自中华人民共和国卫生部临床检测中心。临床分离致病菌株：甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)5株，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)5株，产ESBLs大肠埃希菌5株、非产ESBLs大肠埃希菌5株，铜绿假单胞菌5株(来自成都大学附属医院，在收集单位经VITEK-60自动微生物鉴定仪鉴定再经本实验室用常规方法重新鉴定)，MH(A)培养基(批号：20160218，北京奥博星生物技术有限责任公司)。

药品和试剂：四季青水煎液(同“1.2”项)，美罗培南(批号：150705，海口市制药厂有限公司)。

仪器：灭菌锅(LDZX-75KB，上海申安医疗器械厂)，生物安全柜(HFsafe 1200/C，Class II，Type A/B3，力康发展有限公司)，低速离心机(1500型，湘江

表2 4个产地四季青水煎液抗内毒素作用(mg/mL)  
Tab. 2 Anti-endotoxin effects of *Illicis chinensis* folium water decoction from four places (mg/mL)

产地	水煎液浓度						阴性	阳性
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	对照	对照
广西	-	-	-	+	+	+	-	+
安徽	-	-	-	-	-	+	-	+
河南	-	-	-	+	+	+	-	+
河北	-	-	-	-	+	+	-	+

注：“-”为不产生凝集反应，对内毒素有拮抗作用；“+”为产生凝集反应，对内毒素无拮抗作用；阴性对照为内毒素检查用水，不含内毒素，阳性对照为含内毒素溶液

仪器厂)，隔水式恒温培养箱(GNP-9080，太仓精宏仪器设备有限公司)，电子天平(CPA225D，赛多利斯科学仪器有限公司)，电子天平(BS224S，赛多利斯科学仪器有限公司)，移液枪(100~1000μL，Finntiteppe)，多点接种仪(Denley A 400)，电热恒温水浴锅(北京市医疗设备厂)，电磁炉(苏泊尔)，麦氏比浊管。

3.1.2 方法

采取美国国家临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的琼脂二倍稀释法测定四季青水煎液对实验菌株的体外最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。设定阳性对照药美罗培南浓度按二倍稀释在0.008~128μg/mL范围内，称取美罗培南9.58mg，加入5mL蒸馏水，配制成1.92mg/mL的溶液作为阳性对照溶液；设定各产地2,000mg/mL四季青水煎液浓度按二倍稀释在1~133mg/mL范围内，作为受试溶液。分别取各产地四季青水煎液或美罗培南溶液1mL，加入50℃融化的MH(A)培养基14mL，混匀，待冷却后用多点接种仪分别接种25株MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假

单胞菌，菌液浓度约为10<sup>6</sup>CFU/mL，经35℃ 18~20h培养后观察对细菌的抑制作用，进行MIC测定。

3.1.3 结果

广西、安徽、河南、河北产地四季青水煎液对MSSA、MRSA的MIC基本一致，均为8~33mg/mL；对产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌的MIC也基本一致，均为33~>133mg/mL；对铜绿假单胞菌的MIC为33~133mg/mL。对革兰阳性菌(如金黄色葡萄球菌)的抑制活性以广西产四季青最佳，对革兰阴性菌(如大肠埃希菌和铜绿假单胞菌)的抑制活性以河北产四季青最佳(表3)。

3.2 四季青水煎液与犬空白血浆孵化后体外抑菌作用

3.2.1 材料与仪器

空白犬血浆新鲜采自beagle犬，其余同“3.1.1”项。

3.2.2 方法

根据4个产地四季青水煎液的体外抑菌作用结果，选择综合抑菌活性最强的河北产四季青水煎液1mL，加入新鲜犬空白血浆1mL，混匀，分别在37℃水浴孵化0.5、1、1.5和2h后取出，加入50℃融化的MH(A)培养基13mL，混匀，同“3.1.2”项接种细菌、进行培养，观察对细菌的抑制作用，进行MIC测定。

3.2.3 结果

河北产四季青水煎液与犬空白血浆分别孵化0.5~2h后进行MIC测定，结果对MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的抗菌活性未发生明显改变，MIC范围对MSSA、MRSA分别为8~33和8~17mg/mL，对产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌均为66~133mg/mL，其抗菌活性与孵化时间的长短无关(表4)。

3.3 四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大

表3 四季青水煎液对MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的MIC<sub>R</sub>  
Tab. 3 The MIC<sub>R</sub> values of *Illicis chinensis* folium water decoction of different provinces against MSSA, MRSA, ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-producing *Escherichia coli*, and *P. aeruginosa*

菌株	省份/(mg/mL)				美罗培南/(μg/mL)	菌对照
	广西	安徽	河南	河北		
MSSA(5株)	8	17	17~33	8~17	0.03~0.125	+
MRSA(5株)	8	17	17~33	8~17	0.03~16	+
产ESBLs大肠埃希菌(5株)	33~66	33~66	133~>133	33	<0.008~0.015	+
非产ESBLs大肠埃希菌(5株)	33~>133	33~66	133~>133	33	<0.008~0.015	+
铜绿假单胞菌(5株)	33~133	66	66~133	33	0.125~0.25	+
ATCC29213(1株)	8	17	33	8	0.03	+
ATCC25922(1株)	66	33	>133	33	0.015	+
ATCC27853(1株)	66	66	66	33	0.25	+

注：ATCC29213、ATCC25922和ATCC27853分别为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的质控株

表4 四季青水煎液与犬血浆孵化不同时间后对MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的MIC<sub>R</sub>

Tab. 4 The MIC<sub>R</sub> values of *Ilicis chinensis* folium water decoction incubated with blank plasma of different time against MSSA, MRSA, ESBLs-producing *Escherichia coli*, non-ESBLs-producing *Escherichia coli*, and *P. aeruginosa*

菌株	时间/(mg/mL)				美罗培南/(μg/mL)	菌对照
	0.5h	1h	1.5h	2h		
MSSA(5株)	17~33	8	17~33	8	0.03~0.125	+
MRSA(5株)	17	8	17	8	0.03~16	+
产ESBLs大肠埃希菌(5株)	66~133	66	66	66	<0.008~0.015	+
非产ESBLs大肠埃希菌(5株)	66~133	66~133	66~133	66~133	<0.008~0.03	+
铜绿假单胞菌(5株)	133	66~133	66~133	66~133	0.125~0.5	+
ATCC29213(1株)	17	8	17	<4	0.03	+
ATCC25922(1株)	56	56	56	28	<0.008	+
ATCC27853(1株)	56	56	56	28	0.125	+

注：ATCC29213、ATCC25922和ATCC27853分别为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的质控株；美罗培南为阳性对照，未进行孵化

霉素联合使用时体外抑菌作用

3.3.1 材料与仪器

河北产四季青水煎液，注射用头孢噻肟钠(批号：141202B，四川制药股份有限公司，1.0g)，盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液(批号：C16062401-1，四川科伦药业股份有限公司，100mL/瓶，含左氧氟沙星0.2g，氯化钠0.9g)，硫酸庆大霉素注射液(批号：20140618，河南天方药业股份有限公司，2mL，8万单位)，其他同“3.1.1”项。

3.3.2 方法

用琼脂二倍棋盘稀释法，每次实验取36个培养皿，按6×6(列×行)排序。于1~5列中分别加入1~2mL不同浓度的河北产四季青水煎液，第6列中加入1mL抗生素，均加至第5行止；于1~5行中分别加入1mL不同浓度的抗生素，第6行中加入1mL四季青水煎液，均加至第5列止；第6列中的第6行不加入药液，做为空白菌对照。分别加入50℃融化的MH(A)培养基，使总体积为15mL，混匀，使1~5列中四季青水煎液的浓度为对应MIC的2、1、1/2、1/4和1/8倍，第6列中抗生素浓度为2MIC，1~5行中抗生素的浓度为对应MIC的2、1、1/2、1/4和1/8倍，第6行中四季青水煎液的浓度为2MIC。冷却后用多点接种仪分别接种MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌和非产ESBLs

大肠埃希菌菌液，菌液浓度约为10<sup>6</sup>CFU/mL，经35℃18~20h培养后观察对细菌的抑制作用。以分级抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FIC)进行判断，FIC=(四季青联用时的MIC/四季青单用时的MIC)+(抗生素联用时MIC/抗生素单用时的MIC)。当FIC≤0.5为协同作用，0.5<FIC≤1为相加作用，1<FIC≤2为无关作用，FIC>2为拮抗作用作<sup>[13-14]</sup>。

3.3.3 结果

河北产四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时对20株MSSA、MRSA、产ESBLs大肠埃希菌和非产ESBLs大肠埃希菌的FIC值均在0.5~1(含1)，只具有相加用。表明四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用对各自的抑菌活性没有明显改变(表5)。

4 四季青水煎液对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

4.1 材料与动物

河北产四季青水煎液，氟比洛芬(四川抗菌素工业研究所，99.9%)，羧甲基纤维素钠CMC(批号：F20090508，国药集团化学试剂有限公司)，二甲苯(成都市科龙化工试剂厂，分析纯)。SPF级昆明种雄性小鼠，体重18~20g，购自成都达硕生物科技有限公司，合格证号：SCXK(川)2015-030。

4.2 方法

表5 四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用时的FIC(n=5)

Tab. 5 The FIC values of combined treatment of *Ilicis chinensis* folium water decoction with cefotaxime, levofloxacin and gentamicin (n=5)

试药	MSSA	MRSA	产ESBLs大肠埃希菌	非产ESBLs大肠埃希菌
四季青水煎液+头孢噻肟	0.75~1	>0.5~0.75	>0.5~0.75	>0.5~0.75
四季青水煎液+左氧氟沙星	>0.5~0.75	0.75~1	0.75~1	0.75~1
四季青水煎液+庆大霉素	>0.5~1	0.75~1	0.63~0.75	0.75~1

注：FIC≤0.5为协同作用，0.5<FIC≤1为相加作用，1<FIC≤2为无关作用，FIC>2为拮抗作用

取河北产四季青水煎液用蒸馏水稀释，分别配制得到浓度为64、80和100mg/mL溶液，做为受试溶液。取40只小鼠随机分为5组，每组8只，分别为阴性对照组(生理盐水)，阳性对照组(氟比洛芬60mg/kg)和四季青水煎液低、中、高(1,280、1,600和2,000mg/kg)剂量组。各组动物给药体积为每10g体重0.2mL，四季青水煎液各剂量组、氟比洛芬组和生理盐水组，每日给药1次，连续灌胃2d，末次给药后各组动物左耳内外侧各滴50μL二甲苯溶液，4h后将小鼠脱颈椎处死，沿耳廓基线解剖位置剪下双耳，用直径为8mm打孔器取动物双耳耳片称重，左、右耳片重量之差为肿胀度，结果用SPSS软件统计处理。

表6 四季青水煎液对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 6 The effects of *Ilicis chinensis* folium water decoction on auricle swelling in mice

组别	药物	剂量	耳肿胀度/mg
阴性对照组	生理盐水	20mL/kg	19.13±3.04
低剂量组	四季青水煎液	1,280mg/kg	11.50±3.82*
中剂量组	四季青水煎液	1,600mg/kg	8.63±3.71*
高剂量组	四季青水煎液	2,000mg/kg	10.25±4.37*
阳性对照组	氟比洛芬	60mg/kg	7.63±4.57*

注：“\*”为与阴性对照组比较，经t检验， $P<0.05$

### 4.3 结果

四季青水煎液对二甲苯致小鼠耳肿胀结果显示，与阴性对照组比较，阳性对照组和四季青水煎液各剂量组的耳肿胀度均明显降低，有显著性差异( $P<0.05$ )，四季青水煎液对二甲苯致小鼠耳肿胀有抑制作用的最低剂量为1280mg/kg，量效关系不明显(表6)。

## 5 讨论

4个产地四季青水煎液在浓度6~100mg/mL时具有较强的体外抗内毒素作用，为排除pH变化的影响，实验中分别使用了PBS缓冲液、内毒素检查用水和不同PH缓冲溶液稀释四季青水煎液，结果四季青水煎液体外在pH5.0~8.0时对内毒素均有拮抗作用，在此范围内pH变化无影响，体内抗内毒素作用则有待动物实验验证。

不同产地四季青水煎液均具有一定的抗菌活性，对MSSA、MRSA较好，对产ESBLs大肠埃希菌、非产ESBLs大肠埃希菌和铜绿假单胞菌相对较弱，大部分均在33~133mg/mL之间，与《中国药典》2015版四季青临床用量15~60g/次，以及在此剂量下产生的体内抗菌活性浓度有何关联，尚不明确。四季青水煎液与犬空白血浆在37℃的孵化实验表明血浆中

的酶对四季青水煎液成分的代谢未能明显影响其抗菌活性，推测其抗菌活性不是由代谢物产生，但此项实验并非体内实验，不能完全反映药物在体内真实的代谢过程。四季青水煎液与头孢噻肟、左氧氟沙星和庆大霉素联合使用实验表明，对各自的抑菌活性没有明显改变，提示与传统抗生素联合应用无协同作用。

在抗炎实验的剂量选择中，参考文献报道，四季青水煎液小鼠外用抗炎的浓度低、中、高分别为500、1000和1500mg/mL，给药剂量分别为1250、2500和3750mg/kg<sup>[12,16]</sup>，而按《中国药典》2015版四季青临床口服剂量换算成小鼠口服剂量为250~9000mg/kg，本次实验四季青水煎液浓度选择为2000mg/mL，小鼠口服剂量低、中和高分别为1280、1600和2000mg/kg，其中高剂量为小鼠口服四季青水煎液LD<sub>50</sub> 7200mg/kg的0.3倍，接近动物不发生死亡的最高剂量，结果3个剂量组及阳性组与阴性组比较均具有显著性差异( $P<0.05$ )，表明四季青水煎液具有一定的抗炎作用，与文献[15-16]报道一致，但量效关系不明显，是否与本次实验预先给药天数不够(只预先给药2d，通常需连续给药3d以上)，各剂量组间距较窄和抗炎作用的强度不稳定有关，还有待进一步实验。

本文对4个不同产地四季青水煎液中主要化学成分槲皮素、原儿茶酸和绿原酸的含量进行了测定。结果显示，四季青水煎液抗内毒素作用的强弱与槲皮素的含量高低有一定的关联性，抗菌作用的强弱与原儿茶酸和绿原酸的含量高低有一定的关联性，但这几种成分是否就是四季青水煎液的药效物质基础，或者是药效物质基础之一，或者是需要其他的成分辅助才能发挥作用，还有待进一步研究。

四季青药材在《中国药典》和中药教科书中均被归为典型的清热解毒类中药，而中医“热毒”的物质基础很大程度上为能影响内毒素释放的成分，是清热解毒的科学实质<sup>[17]</sup>。同时，清热解毒中药除抗微生物、中和内毒素外，还能够对机体进行免疫调节，抑制炎症介质的合成和释放，从而改善炎症对组织的损害<sup>[18]</sup>。现阶段临床上清热解毒中药多以水煎服汤剂为主，不适合治疗重、急症感染患者，但因其药理活性多样，除作为中药使用外，也可将其与西药抗生素搭配使用，既可发挥西药较强的抗菌作用，又可发挥清热解毒、增强免疫、清除内毒

素等作用,做到“内外毒素”并治<sup>[19-20]</sup>。四季青清热解毒的药效作用比较确定,但其各药理作用的物质基础还不够明确,本文以四季青为代表,探索清热解毒类中药药理作用的多样性,结果显示,四季青水煎液具有一定的抗内毒素、抗菌和抗炎作用,其中抗内毒素作用较强,是四季青水煎液的主要药理作用,可用于临床抗生素治疗时的清热解毒,对四季青的临床应用和药效物质基础研究均具有一定的参考价值。

### 参考文献

- [1] Spellberg B, Powers J H, Brass E P, *et al*. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future[J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(9): 1279-1286.
- [2] 聂广. 中西医结合传染病研究的目标与任务[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(9): 842-845.
- [3] 李芳芳. 冰片与抗菌药物体外联合抗菌作用的研究[D]. 广州: 广东药学院, 2014.
- [4] 黄圣源. 从中西医对中医药的认识差异谈中医药在全球的发展[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [5] 刘昌孝. 当代抗生素发展的挑战与思考[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(1): 1-12.
- [6] 李松, 郭淑珍, 王建松. 清热解毒的四季青[J]. 首都食品与医药, 2016, 23(7): 64.
- [7] 张玉梅, 李春华, 盛秀涛. 中药四季青的化学成分研究[J]. 吉林中医药, 2010, 30(3): 252-253.
- [8] 甄汉深, 李生茂, 董佳梓. 四季青化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2007, 24(6): 18-20.
- [9] 夏文绮, 崔保松, 李帅. 四季青化学成分的研究[J]. 中草药, 2016, 47(8): 1272-1277.
- [10] 屈巧玲, 杨滨, 王谦鹏, 等. 四季青药材HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(22): 1699-1703.
- [11] 张伟奇, 张梦飞, 席鹏, 等. 四季青水煎液外用抗炎作用[J]. 中医学报, 2016, 31(8): 1146-1149.
- [12] 曹艳, 崔瑞勤, 陈科力, 等. 利胆排毒口服液不同极性部位体外抗内毒素作用研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(2): 48-49.
- [13] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 120-152.
- [14] 王月玲. 黄连素联合头孢他定对产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌抑菌作用的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2005.
- [15] 覃仁安, 陈敏, 梅璇, 等. 四季青水提液和乙醇提取液对小鼠急性炎症的影响[J]. 贵州医药, 1999, 23(6): 416-417.
- [16] 应利晏. 四季青治疗单纯型慢性化脓性中耳炎92例[J]. 中国全科医学, 2000, 3(3): 219-219.
- [17] 刘仰东. 抗生素诱导内毒素血症的研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(9): 1006-1009.
- [18] 唐德才. 清热解毒药的优势与特色[C]. 临床中药学学术研讨会, 2009: 49-52.
- [19] 邓文龙, 徐嘉红, 王文烈, 等. 热毒平的抗内毒素作用研究[J]. 中药药理与临床, 1995, 3(2): 16-19.
- [20] 唐庆芝, 魏长志. 清热解毒药与抗菌、抗病毒药的抗感染作用分析[J]. 河北中医, 2013, 35(6): 910-911.



文章编号: 1001-8689(2018)06-0772-06

## LYRM03联合多黏菌素B治疗小鼠肺炎克雷伯菌肺炎的药效学研究

李鑫<sup>1</sup> 施思<sup>2</sup> 戈梅<sup>3</sup> 冯美卿<sup>2</sup> 赵旭<sup>1,\*</sup> 郭蓓宁<sup>1</sup> 张菁<sup>1</sup>

(1 复旦大学附属华山医院抗生素研究所, 卫生部抗生素临床药理重点实验室, 上海 200040; 2 复旦大学药学院微生物与生化药学, 上海 201203; 3 上海来益生物药物研究开发中心有限责任公司, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 将新化合物LYRM03和多黏菌素B联合用于治疗小鼠肺炎, 拟观察在达到同等治疗效果的情况下, 联合LYRM03是否能够降低多黏菌素B的用量。 **方法** 采用耳窥镜直视下气管插管法建立小鼠肺炎模型, 采用多黏菌素B单药或联合LYRM03的不同给药方案进行治疗, 观察期96h, 从小鼠存活率、体重变化、活动度评分、肺组织细菌载量等指标比较两者的治疗效果。 **结果** 高剂量多黏菌素B治疗组疗效明显优于低剂量组, 但单药与联合用药间无明显差别。多黏菌素B按1和5mg/kg单药治疗组存活率分别为50%和100%, 联合用药后存活率分别为50%和83.3%。单药与联合用药治疗后两组间其余各项观察指标也无显著性差异。 **结论** 联合LYRM03与多黏菌素B单药治疗相比, 疗效没有明显差异, 提示联合LYRM03不能降低多黏菌素B的用量。

**关键词:** 药效学; LYRM03; 多黏菌素B; 联合治疗; 免疫调节; 小鼠肺炎模型

**中图分类号:** R978.1 **文献标志码:** A

## *In vivo* pharmacodynamics of the combination of LYRM03 and polymyxin B in a murine lung infection model caused by *Klebsiella pneumoniae*

Li Xin, Shi Si<sup>2</sup>, Ge Mei<sup>3</sup>, Feng Mei-qing<sup>2</sup>, Zhao Xu<sup>1</sup>, Guo Bei-ning<sup>1</sup> and Zhang Jing<sup>1</sup>

(1 Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Key Laboratory of Clinical Pharmacology of Antibiotics, Ministry of Health, Shanghai 200040; 2 Department of Microbiology & Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 3 Shanghai Laiyi Center for Biopharmaceutical R&D, Shanghai 201203)

**Abstract** **Objective** To examine whether the dose of polymyxin B can be reduced when combined with LYRM03 in a murine lung infection model. **Methods** A murine lung infection model caused by *Klebsiella pneumoniae* was established through a new inoculation method with an otoscope. Pharmacodynamics studies were performed following the administration of polymyxin B monotherapy or combined with LYRM03. The survival rate, weights, activity scores and bacteria loads in lungs over 96h of the groups were observed to compare the therapeutic effects. **Results** The survival rates of the 1 and 5mg/kg polymyxin B groups were 50% and 100%, which were 50% and 83.3% when combined with LYRM03. There were no significant differences in survival rates as well as other indicators between the monotherapy group and the combination therapy group. **Conclusion** There was no significant difference in therapeutic effect between the monotherapy and the corresponding combination therapy group, indicating that the therapy dose of polymyxin B cannot be reduced when combined with LYRM03.

**Key words** Pharmacodynamics; LYRM03; PolymyxinB; Immune regulation; Combination therapy

收稿日期: 2017-06-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81373494); 上海市科委实验动物研究专项基金(No. 15140903300)

作者简介: 李鑫, 女, 生于1993年, 在读硕士研究生, 研究方向为抗生素动物体内药动学/药效学, E-mail: lxxj6311@163.com

\*通讯作者, E-mail: zhaoxush@fudan.edu.cn



近年来,随着广谱抗菌药物,特别是碳青霉烯类在临床上的广泛应用,泛耐药菌株不断增多,如泛耐药肺炎克雷伯菌(*pan drug resistant Klebsiella pneumoniae*, PDR-Kp)、泛耐药鲍曼不动杆菌(*pan-drug resistant Acinetobacter baumannii*, PDR-Ab)等<sup>[1]</sup>,其对目前临床上的常用抗菌药物,包括碳青霉烯类均耐药,但以上泛耐药菌株对多黏菌素B仍保持较高的敏感率,可以说多黏菌素B已经成为治疗泛耐药革兰阴性菌的最后一道防线<sup>[2]</sup>。然而,多黏菌素B肾毒性严重,不良反应发生率高,极大地限制了其在临床上的应用。因此,许多学者希望对多黏菌素B改构或联合其他药物,以降低其给药剂量,达到抗菌效果不变的情况下,降低其肾毒性。其中,使用免疫调节剂改善免疫功能成为一项重要手段<sup>[3-4]</sup>。LYRM03是一种新型氨基酸类化合物,从一株小链霉菌的次级代谢产物中分离获得,初步研究表明该化合物可能具有免疫功能调节作用。抗菌活性研究结果表明LYRM03能用于制备抑制革兰阳性菌的药物。进一步对新化合物LYRM03进行研究发现,它能够抑制APN(aminopeptidase N, APN)的活性,并且其对APN的抑制活性优于已上市的APN抑制剂苯丁抑制素<sup>[5]</sup>。APN是一种含锌离子的膜结合型外肽酶,它对原发肿瘤和继发肿瘤的生长和增殖分化过程都起到促进作用,现多被用于抗肿瘤药物研究中。同时,APN与单核细胞、巨噬细胞、粒细胞及其前体细胞的活化与分化有关,并且能够表达于抗原递呈细胞表面,降解多种免疫活性物质,使机体免疫力下降。现已有研究表明,APN还参与了巨噬细胞和树突状细胞的噬菌过程<sup>[6]</sup>。已有合作课题组对LYRM03进行了机制方面的研究,其在脓毒症引起的急性肺损伤小鼠模型中,给予剂量为10mg/kg LYRM03单药治疗,发现24h内小鼠肺部损伤不同程度减轻,同时小鼠免疫细胞聚集和促炎因子产生情况也发生了相应改变,未见对小鼠产生明显毒性<sup>[7]</sup>,因此本文以该研究作为基础进行了进一步的动物实验。如果通过LYRM03的APN抑制活性能够增强机体免疫力,与抗菌药联用产生协同抗菌作用,就可以降低抗菌药物的剂量,减少患者的药物暴露量,从而减少药物的不良反应和预防耐药菌产生,同时增加患者用药依从性,这为抗感染治疗提供了新思路。

动物感染模型作为新化合物药效学及药理机制研究的工具,在新抗菌药物开发中扮演了重要角

色,目前已建立了不同类型的动物感染模型,包括小鼠肺炎模型、小鼠尿路感染模型、大鼠脑膜炎模型等<sup>[8]</sup>。本研究利用动物肺炎模型,对LYRM03联合多黏菌素B的体内药效学进行了研究,将两药联合用于治疗小鼠肺炎,观察联用LYRM03是否能够降低多黏菌素B的用量,从而在保证疗效的同时降低多黏菌素B的毒性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

肺炎克雷伯菌K161, K161为肝脓肿患者血培养分离菌株,于2010年分离自复旦大学附属华山医院,微量稀释法结果显示该菌对临床常用抗革兰阴性菌药物亚胺培南、头孢他啶、替加环素、左氧氟沙星、阿米卡星等均敏感,前期研究结果表明, K161毒力较强,能够在小鼠正常免疫状态下造成肺炎,在不给予治疗的情况下小鼠死亡率为100%。

#### 1.1.2 药品及试剂

化合物LYRM03为粉剂,纯度>99%(上海来益生物药物研究开发中心有限责任公司);多黏菌素B,批号201205,纯度>95%(上海维编科贸有限公司);麻醉剂2,2,2-三溴乙醇,批号:STBC1157V(Sigma公司);LB broth培养基,批号:14012937G, LB agar培养基,批号:14012950G(上海生工公司)。

#### 1.1.3 实验动物

SPF级ICR小鼠,鼠龄6周左右,体质量(25±2)g,雌性,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2013-0006,饲养于复旦大学药学院实验动物中心。

#### 1.1.4 实验器具及仪器

RW-A3747小鼠气管插管工具箱,包括电池手柄、耳镜头、3.5mm耳窥镜、门齿环、小鼠气管内导管、喉镜(美国Braintree公司);1.1mm×30mm一次性使用静脉留置针(BD公司);RW-A3467啮齿动物工作台(美国Braintree公司);Innova 4200型摇床(美国New Brunswick科技公司);XS205型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);UV-2102C型紫外可见分光光度计(美国Unic公司);Precellys 24型多功能组织匀浆机(法国Bertin公司);CR21G II型低温高速离心机(日本Hitachi公司);无菌剪刀、镊子等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 构建小鼠肺炎克雷伯菌肺炎模型

(1)菌液制备:挑取一次性LB平板纯分后生长的肺炎克雷伯菌若干个菌落,置于15mL LB液体培养基内于摇床中37℃、150r/min振荡过夜,第二日取400μL过夜培养菌液加入20mL LB液体培养基内(2%接种),同等条件摇床培养约1h至OD值0.4左右(630nm),取1mL细菌悬液4℃、4,000r/min离心10min,弃上清液后用1mL灭菌生理盐水重悬制备细菌原液。细菌原液用生理盐水50倍稀释(稀释菌液),取100μL稀释菌液经系列稀释后接种于一次性LB平板培养16h后进行菌落计数,确定稀释菌液浓度(稀释菌液浓度约 $2\sim 5\times 10^5$ CFU/mL)。

(2)小鼠气管插管及菌液注射:采用2,2,2-三溴乙醇(25mg/kg)对小鼠进行腹腔注射,待小鼠麻醉后仰卧位固定小鼠于啮齿动物工作台上,采用美国Braintree公司气管插管工具箱进行耳窥镜直视小鼠气管插管<sup>[9]</sup>。气管插管成功后,沿气管插管注射10μL肺炎克雷伯菌菌液,吹打3次,确保菌液全部进入小鼠肺部。

(3)小鼠肺组织细菌定量:感染后2h,颈椎脱臼法处死小鼠,无菌操作取出小鼠全肺,每0.1g肺组织加入0.9mL生理盐水,组织匀浆机研磨后取100μL进行系列稀释,随后接种于LB培养基培养16h后进行菌落计数,继而计算出基线水平肺组织的细菌含量(Log<sub>10</sub> CFU/g肺组织)。

### 1.2.2 多黏菌素B单药治疗药效学研究

(1)试验分组及治疗方案:25只小鼠分为5组,每组5只。小鼠感染2h后开始治疗,治疗期为72h,腹腔注射给药,具体分组及给药方案如下<sup>[10]</sup>:①感染对照组,不用药;②P0.2组,每次给予多黏菌素B 0.2mg/kg, q12h;③P1组,多黏菌素B 1mg/kg, q12h;④P5组,多黏菌素B 5mg/kg, q12h;⑤P20组,多黏菌素B 20mg/kg, q12h。

(2)观察指标:在首剂给药后0~96h内,每12h观察并记录各组小鼠死亡情况。

(3)确定多黏菌素B具有保护作用的剂量:根据多黏菌素B单药治疗小鼠的存活率结果,选择存活率位于50%左右的剂量以及一个相对较大和较小剂量作为后续联合用药药效学研究中多黏菌素B的用药剂量,观察联合LYRM03用药是否可以提高小鼠存活率。

根据试验结果,1和5mg/kg多黏菌素B治疗组存活率分别为0、60%和80%,故确定后续“多黏菌素B联合LYRM03药物疗效评价”研究中采用的多黏菌

素B用药剂量为1和5mg/kg。

### 1.2.3 多黏菌素B联合LYRM03治疗药效学研究

(1)试验分组:感染对照组设9只小鼠,其余为每组6只。分为感染对照组、P1组、P1NR组、P5组和P5NR组。

(2)药物治疗方案:小鼠感染2h后开始治疗,治疗期为72h,各组给药方案如下:①感染对照组:不用药;②P1组:多黏菌素B 1mg/kg, q12h;③P1NR组:LYRM03 10mg/kg, q24h;多黏菌素B 1mg/kg, q1h;④P5组:多黏菌素B 5mg/kg, q12h;⑤P5NR组:LYRM03 10mg/kg, q24h;多黏菌素B 5mg/kg, q12h。

(3)观察指标:①存活率:在首剂给药后0~96h内,每12h观察并记录各组小鼠的死亡情况,②体重变化:每24h记录一次各组小鼠体重;③活动度评分:观察小鼠体型、进食、活动、体毛等变化情况进行并打分,小鼠活动度评分标准如下:

0分:小鼠活动正常、毛发正常,无异常表现;

-1分:毛发凌乱,但活动度尚可,仍较活跃;

-2分:毛发凌乱,活动迟缓;

-3分:毛发凌乱,眼睛基本闭合,身体蜷缩,无法活动,病重;

-4分:无法站立,垂死状态;

-5分:死亡。

④肺组织菌落定量:于96h将各组存活小鼠处死,采用无菌操作取出小鼠全肺,按照“1.2.1”项下方法进行肺组织菌落计数。

## 2 结果

### 2.1 小鼠肺炎模型构建结果

实验中分别采用了不同浓度的肺炎克雷伯菌菌液对小鼠进行感染,发现当菌液浓度大于 $10^5$ CFU/mL时,感染后96h内死亡率均可达100%(图1)。

建立小鼠肺炎模型时使用的肺炎克雷伯菌K161菌液浓度为 $2.2\times 10^5$ CFU/mL,于感染后2h处死3只小鼠进行肺组织菌落计数,获得小鼠肺部活菌量基线水平;在96h观察期内取感染致死小鼠进行肺组织活菌量计数,计数结果如表1所示。结果表明,该气管插管法平行性较好,小鼠在感染后均出现活动减缓、体重下降、毛发凌乱等症状,且60~84h内全部死亡。

### 2.2 多黏菌素B单药及联合LYRM03治疗结果

多黏菌素B 5和1mg/kg单药治疗,感染小鼠的存活率分别为100%和50%,高剂量组的单药疗效明显

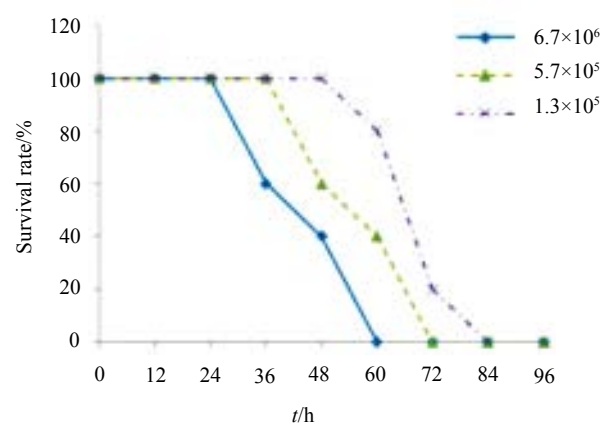


图1 小鼠感染不同浓度肺炎克雷伯菌后96h存活率变化(n=5)  
Fig. 1 Mice survival rate over 96h following intratracheal inoculation of *K. pneumoniae* K161 at different inoculums size (n=5)

表1 不同时间点小鼠肺组织中肺炎克雷伯菌菌量(n=3)

Tab. 1 Colony counts of *K. pneumoniae* in the lungs of infected mice at different time (n=3)

时间点	肺组织细菌载量* (Log <sub>10</sub> CFU/g肺组织)
感染后2h	5.34±0.40
感染死亡后(60~84h)	10.46±0.10

\*表中数据为 $\bar{x}\pm SD$

优于低剂量组(图2~3)。比较其他观察指标, P1、P5单药治疗组96h平均体重分别为15.7和17.8g, 活动度评分情况P5组优于P1组, 肺组织活菌量log<sub>10</sub>CFU值分别为10.29和2.86(图3~4), 数据显示高剂量组疗效明显优于低剂量组。

多黏菌素B 1mg/kg单药和联用LYRM03治疗比较, 存活率均为50%(图3), 96h体重分别为15.7和16.3g, 活动度评分均为-4分, 肺组织菌量log<sub>10</sub>CFU值分别为10.29和10.44(图3~4), 进行 $\chi^2$ 检验显示各项指标之间无显著性差异( $P>0.05$ ), 提示低剂量多黏菌素B单药与联合用药无明显疗效差异。

多黏菌素B 5mg/kg单药及联合LYRM03治疗均显示出较好治疗效果, 存活率分别为100%和83.3%, 96h平均体重、肺组织菌落计数、活动度打分等指标均相近, 进行 $\chi^2$ 检验显示两组各项指标之间无显著性差异( $P>0.05$ ), 表明高剂量多黏菌素B单药治疗和联合LYRM03治疗同样未显示出明显差异(图3~4)。

### 3 讨论

多黏菌素B作为治疗广泛耐药菌的最后一道防线, 其临床有效率可达76%~95%<sup>[11]</sup>。然而由于多黏菌素B肾毒性较大, 且存在诸多其他不良反应等, 限制了其在临床上的广泛应用, 在我国多黏菌素B至今仍未上市。如果降低多黏菌素B的剂量则可以减少不

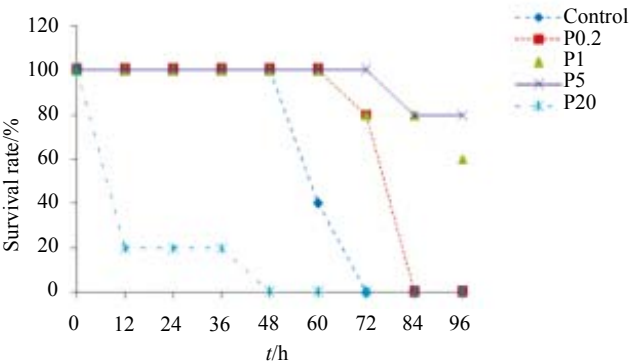


图2 肺炎克雷伯菌肺炎小鼠接受不同剂量多黏菌素B单药治疗后96h内存活率变化(n=6)

Fig. 2 Mice survival rate over 96h following intratracheal inoculation of *K. pneumoniae* K161 and treatment with polymyxin B at 0.2mg/kg (P0.2), 1mg/kg (P1), 5mg/kg (P5) and 20mg/kg (P20) (n=6)

良反应发生率, 提高患者的耐受性。若LYRM03通过提高宿主免疫能力, 与多黏菌素B联合使用能提高其疗效, 就有可能在临床应用时降低多黏菌素B的剂量, 故本研究中选择多黏菌素B作为试验用药。

在既往小鼠动物模型药效学试验中, 常采用环磷酰胺等免疫抑制剂造成小鼠短暂免疫缺陷, 而本研究拟证明LYRM03的免疫增强作用, 故采用动物试验验证其效果时, 不能采用先天免疫缺陷小鼠或注射免疫抑制剂造成小鼠免疫缺陷。由于细菌大多存在适应性代价, 泛耐药菌往往毒力较弱, 如肺炎克雷伯菌K65等不能形成肺炎或小鼠病死率极低<sup>[12]</sup>, 给药后无法直接证明药物的保护作用, 而高毒力泛耐药临床分离株鲜有报道, 结合研究目的, 本试验选择了一株高毒力敏感临床分离肺炎克雷伯菌K161作为试验菌株。前期研究结果表明, K161毒力较强, 能够在小鼠正常免疫状态下造成肺炎, 在不给予治疗的情况下小鼠死亡率为100%。

研究结果中单药和联合用药组的小鼠存活率、体重变化、肺组织菌落计数、活动度打分等各项指标均无显著性差异, 初步表明联合LYRM03给药不能降低多黏菌素B的剂量。多黏菌素B 20mg/kg治疗组第1次给药后死亡率即达80%, 可能为剂量过大产生毒性导致。联用LYRM03未能降低多黏菌素B的剂量, 一方面可能由于抗菌药物的选择不当, 若与其他类抗菌药如头孢菌素、喹诺酮类药物联合, 是否会产生协同作用还需进一步研究。另一方面, 由于试验中选择的致病菌株毒力过强, 可能通过机体自身免疫调节功能不足够产生对该细菌的清除作用。同时, 在给药方案中, LYRM03和多黏菌素B均在感

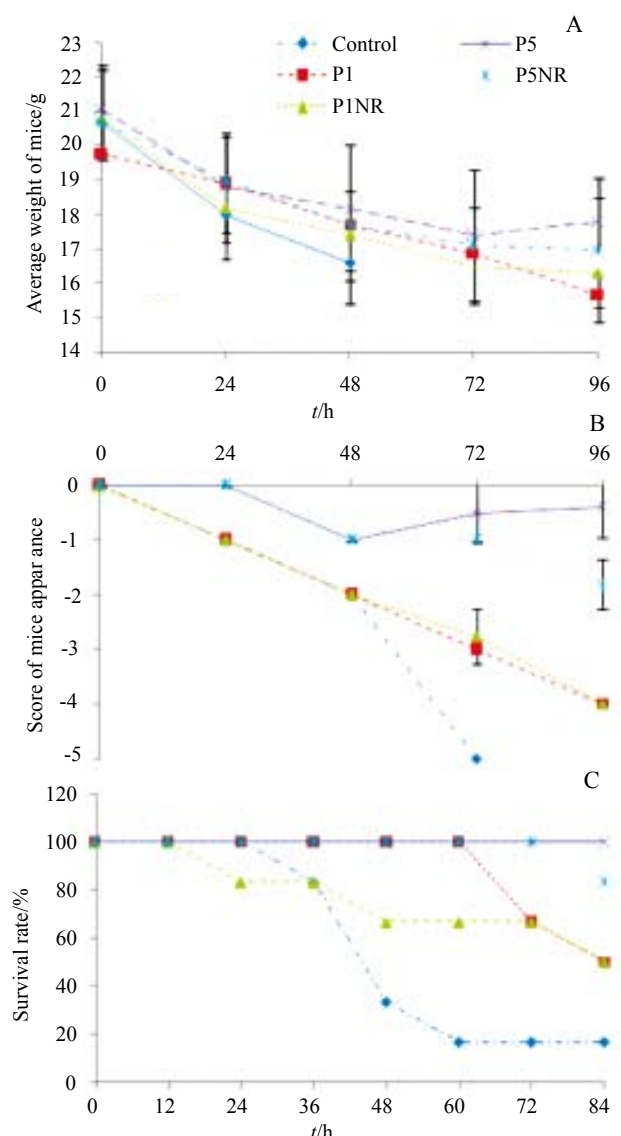


图3 肺炎克雷伯菌肺炎小鼠接受不同剂量多黏菌素B单药或联合LYRM03治疗后96h平均体重(A)、平均活动度打分(B)及存活率(C)变化(n=6)

Fig. 3 Average weight (A), activity scores(B) and mice survival rate (C) over 96h following intratracheal inoculation of *K. pneumoniae* K161 and treatment with polymyxin B at 1mg/kg (P1), 5mg/kg (P5), or combined with 10mg/kg LYRM03 (P1NR and P5NR) (n=6)

染后2h开始给药, LYRM03作为免疫调节剂, 可能需要在感染前先给药一段时间形成机体免疫增强环境以发挥保护作用, 即作为预防用药使用<sup>[13]</sup>。

在动物肺炎模型中, LYRM03没有表现出与多黏菌素B的协同作用, 但它已被证明具有APN抑制活性<sup>[5]</sup>, 若要进一步确定它是否具有免疫调节活性, 还需从免疫学方面进行相关研究。从动物模型来讲, 可以在给药后取小鼠血和肺泡灌洗液样本, 测定体液样本中巨噬细胞数量变化以及IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 等炎症反应相关细胞因子的变化水平<sup>[14]</sup>, 观察抗菌药单

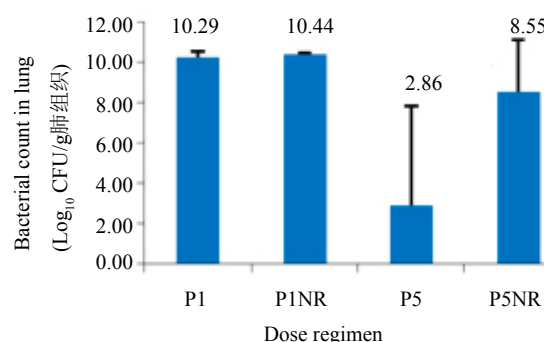


图4 肺炎克雷伯菌肺炎小鼠接受不同剂量多黏菌素B单药或联合LYRM03治疗后96h肺组织细菌载量变化(n=6)

Fig. 4 Bacterial count in lungs over 96h following intratracheal inoculation of *K. pneumoniae* K161 and treatment with polymyxin B at 1mg/kg (P1), 5mg/kg (P5), or combined with 10mg/kg LYRM03 (P1NR and P5NR), the data was expressed as  $\bar{x} \pm SD$  (n=6)

药治疗和联合LYRM03治疗后相关因子水平是否有差别; 同时可以进行体外实验, 将分离出的肺泡巨噬细胞与细菌共同培养, 再用LYRM03进行干扰, 观察巨噬细胞本身对细菌的清除作用是否增强<sup>[15]</sup>。LYRM03作为天然来源的新化合物, 与其活性相关的研究仍比较少, 除药效学研究外, 需要进一步的机制性研究来确定其开发和应用前景。

**致谢:** 本项目在复旦大学附属华山医院抗生素研究所临床药理实验室与复旦大学药学院微生物与生化药理学实验室完成, 感谢张菁教授、冯美卿教授为本项目的开展提供实验平台, 感谢郭蓓宁教授、赵旭副主任医师、戈梅老师对本项目的悉心指导, 同时感谢给予本实验无私帮助的老师 and 同学们。

## 参考文献

- [1] 刘又宁, 曹彬, 王辉, 等. 中国九城市成人医院获得性肺炎微生物学与临床特点调查[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(10): 739-746.
- [2] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2015年CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(6): 685-694.
- [3] Fura J M, Sarkar S, Pidgeon S E, et al. Combatting bacterial pathogens with immunomodulation and infection tolerance strategies[J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 3(17): 290-304.
- [4] 杨丽君. 免疫增强剂、抗生素联合治疗儿童反复呼吸道感染临床观察[J]. 中国医药导报, 2008, (09): 59-60.
- [5] Rao M, Li Q, Feng L, et al. A new aminopeptidase inhibitor from *Streptomyces* strain HCCB10043 found by UPLC-MS[J]. *Analyt Bioanalyt Chem*, 2011, 401(2): 699-706.
- [6] Villaseñorcardoso M I, Fraustodelrío D A, Ortega E. Aminopeptidase N (CD13) is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages[J]. *Biomed Res Int*, 2013, (23): 562984.