

- 取甘木通总黄酮工艺的研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 2040-2042.
- [5] 刘静波, 刘文超, 徐梦蕾, 等. 基于PC12细胞模型分析大豆蛋白水解物对神经元氧化损伤的保护作用[J/OL]. 现代食品科技, [2015-01-21]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1620.TS.20150121.1521.008.html>.
- [6] 胡炜彦, 于浩飞, 张荣平. 人参皂苷Rg<sub>3</sub>对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>导致海马神经元损伤的保护作用研究[J]. 中成药, 2014, 36(4): 670-674.
- [7] 王世博, 邱景富, 白群华, 等. 黄芪甲苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>致PC12细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(11): 1603-1609.
- [8] 赵文杰, 何丽, 张茜, 等. 卷柏总黄酮对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致PC12细胞损伤的保护作用[J]. 中国医药指南, 2012, 10(3): 224-225.
- [9] Chade A R, Lerman A, Lerman L O. Kidney in early atherosclerosis[J]. *Hypertension*, 2005, 45(6): 1042-1049.
- [10] 黄海潮. KIAA0280在缺氧诱导神经元凋亡中的作用研究[D]. 广州: 广东药学院, 2008.
- [11] 王志成, 吕晓红. 缺血性脑卒中的氧化应激相关因子研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(1): 87-89.

## 大蒜素与盐酸小檗碱联用体外抗菌试验

孙艳, 李娜, 陆颖, 余圆圆, 陈钧\*  
(江苏大学药学院, 江苏镇江212013)

**摘要:** **目的** 研究大蒜素联合盐酸小檗碱对临床常见菌及耐药菌的抗菌效果。**方法** 采用微量肉汤稀释法测定供试药物对4个常见菌, 2个标准菌, 和2个耐药菌的最小抑菌浓度(MIC), 微量棋盘稀释法和时间-杀菌曲线法评价两药对各试验菌株的联合作用。**结果** 当两药单独应用时, 其MIC值范围分别为大蒜素156.25(敏感株)~1250(耐药株) μg/mL, 盐酸小檗碱78.125(敏感株)~312.5(耐药株) μg/mL。当两药联合应用时, 部分抑菌浓度指数(FICI)值为0.75~1, 为相加作用。从24 h时间-杀菌曲线可以发现, 当两药单独应用时, 即使在4×MIC下, 也未能显示杀菌效应, 而联用时在相对较低质量浓度下显示出杀菌作用; 还显示出在低于MIC下具有弱协同(敏感株)或者相加作用(耐药株)。**结论** 大蒜素和盐酸小檗碱联合应用, 具有良好的抗菌作用。

**关键词:** 大蒜素; 盐酸小檗碱; 抗菌; 协同作用

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2015)12-2589-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2015.12.004

## *In vitro* antibacterial activity of allicin in combination with berberine hydrochloride

SUN Yan, LI Na, LU Ying, YU Yuan-yuan, CHEN Jun\*

(School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**ABSTRACT: AIM** To study the *in vitro* activity of allicin (diallyl trisulfide) in combination with berberine hydrochloride to common and drug-resistant bacteria. **METHODS** The broth dilution method was used to test individual minimal inhibitory concentrations (MIC) of four common, two control and two resistant bacteria. The checkerboard dilution and time-kill curve tests were performed on antibacterial synergy effects. **RESULTS** The MIC of allicin were in the ranges of 156.25 (sensitive bacteria) and ~1250 μg/mL (drug-resistant bacteria); the MIC of berberine hydrochloride were in the ranges of 78.125 (sensitive bacteria) and ~312.5 μg/mL (drug-resistant bacteria). The fractional inhibitory concentration index (FICI) of allicin plus berberine hydrochloride

收稿日期: 2015-02-13

作者简介: 孙艳(1990—), 女, 硕士生, 研究方向为天然产物活性成分筛选及应用。Tel: 18261931810, E-mail: yansun901020@126.com

\*通信作者: 陈钧(1947—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为生物活性成分和新药开发以及生物资源有效成分的分离与应用。Tel: 13812461762, E-mail: shchen@ujs.edu.cn

ranged from 0.75 to 1. 24 h time-kill curve assay showed no bactericidal activity against all test strains even with  $4 \times \text{MIC}$  used alone. However, when used together under the same concentrations, they showed bactericidal activity with synergy and additional effects. **CONCLUSIONS** The experimental data reveal that the combination of allicin and berberine hydrochloride have moderate antibacterial effect.

**KEY WORDS:** allicin (diallyl trisulfide); berberine hydrochloride; antibacterial effect; synergism

大蒜素 (diallyl trisulfide, DATS), 为百合科葱属植物大蒜中的一种有机硫化物, 在熟大蒜中含有量较高<sup>[1-3]</sup>。它具有广谱的抗菌<sup>[4]</sup>、抗真菌<sup>[5]</sup>、抗衣原体、抗支原体和抗病毒<sup>[6]</sup>等作用。目前, 大蒜素胶囊已用于临床治疗由病毒和细菌感染的疾病。盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride, BBH), 为小檗科植物中一种天然的异喹啉类生物碱, 具有广谱抗菌作用<sup>[7]</sup>, 其片剂和胶囊一直应用于临床。我国古代经典中医药学著作《普济本事方》记载有“治脏毒, 蒜连圆。鹰爪黄连末, 用独头蒜一颗, 煨香烂熟, 研和入臼, 治圆如梧子大。陈米饮下。此药神妙”处方。该处方用于治疗脏毒 (即肠道感染性疾病), 按照现代研究, 该方剂的主要药效成分为大蒜素和盐酸小檗碱<sup>[8-10]</sup>。

现代公共卫生面临的问题之一是耐药菌及其引起的慢性感染性疾病。而目前尚未见该处方的两种主要成分大蒜素和盐酸小檗碱联合应用时的抗耐药菌活性研究, 故本试验进行了大蒜素和盐酸小檗碱抗六种肠道病原菌的活性研究, 并重点进行了抗产超广谱内酰胺酶大肠埃希菌及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的活性研究。

## 1 实验材料与仪器

1.1 供试药物 大蒜素 (DATS, 批号 20131129, 江苏正大清江制药有限公司); 盐酸小檗碱 (BBH, 批号 20140115, 南京春秋生物科技有限公司); 注射用硫酸链霉素 (批号 120418, 山东鲁抗医药股份有限公司); 注射用青霉素钠 (批号 S120705, 山东鲁抗医药股份有限公司)。

1.2 试验菌株 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 29213、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853 (镇江市疾病预防控制中心); 溶血性葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产超广谱内酰胺酶大肠埃希菌 (producing extended-spectrum beta-lactamases *E. coli*, ESBLs)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus au-*

*reus*, MRSA) (江苏大学附属江滨医院病理科)。

1.3 主要试剂及仪器 SPX-250B 型生化培养箱 (上海跃进医疗器械厂); SHZ-88 型水浴恒温振荡器 (江苏省金坛市医疗器械厂); SW-CJ 2FD 双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); TG328A 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); LS-B50L 型立式压力蒸汽灭菌器 (江苏省金坛市医疗器械厂); 96 孔微量板 (美国 Corning 公司); 可调式移液枪 (美国 Thermo electron corporation)。

吐温-20 (批号 20140603, 国药集团化学试剂有限公司); 氯化三苯四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride, TTC, 上海试剂三厂); MHB、MHA 培养基 (南京森贝伽生物科技有限公司)。

## 2 实验方法

2.1 供试药液的制备 大蒜素溶液的制备: 以 20% 的吐温-20 为溶剂, 配置 10 mg/mL 的大蒜素溶液。盐酸小檗碱试剂: 以无菌水为溶剂, 配置 5 mg/mL 的盐酸小檗碱溶液。硫酸链霉素、青霉素钠溶液的制备: 以生理盐水为溶剂, 配置 1 280 U/mL 的溶液。

2.2 菌悬液的制备 将各试验菌株接种于 MHA 培养基上, 37 °C 活化培养增菌 18 ~ 24 h, 取单个菌于 MHB 培养基上, 37 °C 培养 18 ~ 24 h。用灭菌生理盐水调整浊度至 0.5 麦氏 (约为  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL), 备用。

2.3 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的测定 采用标准微量肉汤稀释法<sup>[11]</sup>, 分别测定大蒜素与盐酸小檗碱对几种试验菌株的 MIC 值。在灭菌 96 孔平底微量板上, 第 1 列每孔加入 100  $\mu\text{L}$  供试药液和 100  $\mu\text{L}$  的 MHB 培养基, 混匀后, 取第 1 列中药液 100  $\mu\text{L}$  加入到第 2 列每孔, 与第 2 列每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  的 MHB 培养基混匀后, 从第 2 列中取 100  $\mu\text{L}$  加入第 3 列, 依次按照液体的 2 倍稀释法将已制备的大蒜素及盐酸小檗碱溶液分别稀释至 5 ~ 0.039 06 mg/mL 和 2.5 ~ 0.019 53 mg/mL。同时做溶剂对照, 注射用硫酸链霉素和注射用青霉素钠做阳性药物对照。加入已调至约  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL 的各试验菌株的菌悬液

10  $\mu\text{L}$ , 最后的接种量控制在  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL。在 37  $^\circ\text{C}$  下, 培养 18 ~ 24 h。然后, 每孔加入 0.25% TTC 5  $\mu\text{L}$ , 继续培养 2 h。用肉眼观察培养孔, 呈现红色为有菌生长, 在阴性溶剂对照的前提下, 判断供试样品是否具有抗菌活性, 记录结果。每次试验重复 3 次。

采用 TTC 判定 MIC 的原理<sup>[12]</sup>, 即 TTC 可被活菌细胞内的琥珀酸脱氢酶等呼吸酶, 还原成不溶性的红色甲臢颗粒, 使活菌呈现红色, 以鉴别菌体细胞活性。鉴于在常规操作下, 中药天然产物实际已不能完全正确地反映样品的抑菌能力, 本研究采用 TTC 对菌体染色, 鉴别菌体细胞活性, 以不能显示的质变范围来判读抑菌效果, 保证实验结果的准确性和可靠性。

2.4 微量棋盘稀释法 采用微量棋盘稀释法, 测定大蒜素和盐酸小檗碱两药联合的抗菌效果。在 96 孔平底微量培养板上, 以二维棋盘的纵向 (A ~ H) 和横向 (1 ~ 12) 两个方向, 根据两药单用时对试验菌株的 MIC 值 (分别记为 MIC<sub>a</sub> 和 MIC<sub>b</sub>), 将两药分别以  $4 \times \text{MIC} \sim 1/16 \times \text{MIC}$  的质量浓度联合应用。加入已制备的  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液 10  $\mu\text{L}$ , 至最终菌悬液为  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL。在 37  $^\circ\text{C}$  下, 培养 18 ~ 24 h。然后, 每孔加入 0.25% TTC 5  $\mu\text{L}$ , 继续培养 2 h。用肉眼观察培养孔, 呈现红色为有菌生长。每次试验重复 3 次。考察每一种药物联用时的 MIC (分别记为 MIC<sub>A</sub> 和 MIC<sub>B</sub>), 通过计算部分抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI),  $\text{FICI} = \text{MIC}_A/\text{MIC}_a + \text{MIC}_B/\text{MIC}_b$ , 判断两药体外药效学相互作用: FICI  $\leq 0.5$  时, 两药为协同作用;  $0.5 < \text{FICI} \leq 1$  时, 两药为相加作用;  $1 < \text{FICI} \leq 2$  时, 两药为无关作用; FICI  $> 2$  时, 两药为拮抗作用<sup>[13-14]</sup>。

2.5 24 h 时间—杀菌曲线法 采用时间—杀菌曲线试验<sup>[15]</sup>, 对大肠埃希菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、ESBLs 及 MRSA 单独应用时的杀菌效果及联合应用时的杀菌作用效果进行考察。以各试验菌株的 MIC 值的实验结果为依据, 将两药分别稀释为  $1/4 \times \text{MIC}$ 、 $1/2 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$  和  $2 \times \text{MIC}$ 。加入已制备的  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液至最终菌悬液为  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL。在 37  $^\circ\text{C}$  下振荡培养。然后, 于 0、1、2、4、8、12、24 h 取 10  $\mu\text{L}$  菌悬液按 10 倍倍比稀释, 取 100  $\mu\text{L}$  稀释液均匀涂布于 MHA 平板上。37  $^\circ\text{C}$  培养 18 ~ 24 h 后进行菌落计数。以时间点为横坐标, 以不同时间

点生长的菌落数的对数为纵坐标绘制时间杀菌曲线。每次试验重复 3 次。

两药联合时间—杀菌曲线, 将两药分别稀释为  $1/4 \times \text{MIC}$ 、 $1/2 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$  和  $2 \times \text{MIC}$ , 各取 2.5 mL 置于试管中, 使最终药物体积为 5 mL。加入已制备的  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液至最终菌悬液为  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL。在 37  $^\circ\text{C}$  下振荡培养。然后, 于 0、4、8、12、24 h 取 10  $\mu\text{L}$  菌悬液按 10 倍倍比稀释, 取 100  $\mu\text{L}$  稀释液均匀涂布于 MHA 平板上。37  $^\circ\text{C}$  培养 18 ~ 24 h 后进行菌落计数。以时间点为横坐标, 以不同时间点生长的菌落数的对数为纵坐标绘制时间杀菌曲线。每次试验重复 3 次。

根据文献报道, 通过比较两药联用时在 24 h 的菌落数  $\log_{10}$  CFU/mL 与单药应用时抑菌活性最好的药物在 24 h 的菌落数  $\log_{10}$  CFU/mL 之差  $\Delta\text{LC}_{24}$ <sup>[16]</sup>:  $\Delta\text{LC}_{24} \geq 2$ , 协同作用;  $1 \leq \Delta\text{LC}_{24} < 2$ , 相加作用;  $-1 \leq \Delta\text{LC}_{24} < 1$ , 无关作用;  $\Delta\text{LC}_{24} < -1$ , 抵抗作用。同时, 用两药联用时 24 h 的菌落数  $\log_{10}$  CFU/mL 与 0 h 的菌落数  $\log_{10}$  CFU/mL 之差  $\geq 3$  或者  $< 3$  判断两药联用为抑菌作用或者杀菌作用<sup>[17]</sup>。

### 3 结果

3.1 MIC 值及微量棋盘稀释法 实验结果显示, 注射用硫酸链霉素和注射用青霉素钠对大肠埃希菌 (ATCC 25922) 和金黄色葡萄球菌 (ATCC 29213) 的 MIC 值为 20 U/mL 和 2.5 U/mL, 与文献报道类似<sup>[18]</sup>。大蒜素对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (ATCC 29213)、溶血性葡萄球菌、表皮葡萄球菌的 MIC 值分别为 156.25、625、625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 盐酸小檗碱的 MIC 值分别为 156.25、78.125、156.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (表 1)。当两药联用时其 FICI 值为 0.75、1、0.75, 显示为相加作用。大蒜素对革兰氏阴性菌大肠埃希菌 (ATCC 25922)、铜绿假单胞菌 (ATCC 27853)、肺炎克雷伯菌的 MIC 值分别为 156.25、312.5、156.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 盐酸小檗碱的 MIC 值分别为 156.25、156.25、312.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当两药联用, 都为相加作用 (表 2)。对产超广谱内酰胺酶大肠埃希菌 (ESBLs) 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA), 大蒜素联合盐酸小檗碱具有相加的抑菌作用 (表 3)。

实验结果显示, 当两药联用时对所有试验菌株表现出良好的相加抑菌效果。同时, 由表 1 ~ 3 可知, 硫酸链霉素对耐药菌 ESBLs 的 MIC 值为质控菌大肠埃希菌 (ATCC 25922) 的 32 倍, 而在相同的条件下大蒜素为 2 倍, 盐酸小檗碱为 1 倍; 青霉

表1 大蒜素及盐酸小檗碱对革兰氏阳性菌的抗菌作用

Tab. 1 Antibacterial effects of DATS and BBH against gram-positive bacterium

受试菌株	青霉素/(U·mL <sup>-1</sup> )	大蒜素/(mg·mL <sup>-1</sup> )		盐酸小檗碱/(mg·mL <sup>-1</sup> )		FICI	作用方式
		单用	联用	单用	联用		
金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)	2.5	0.156 25	0.078 125	0.156 25	0.039	0.75	相加
溶血性葡萄球菌(201401021)	80	0.625	0.312 5	0.078 125	0.039	1	相加
表皮葡萄球菌(201401022)	320	0.625	0.312 5	0.156 25	0.039	0.75	相加

表2 大蒜素及盐酸小檗碱对革兰氏阴性菌的抗菌作用

Tab. 2 Antibacterial effects of DATS and BBH against gram-negative bacterium

受试菌株	硫酸链霉素/(U·mL <sup>-1</sup> )	大蒜素/(mg·mL <sup>-1</sup> )		盐酸小檗碱/(mg·mL <sup>-1</sup> )		FICI	作用方式
		单用	联用	单用	联用		
大肠埃希菌(ATCC 25922)	20	0.156 25	0.078 125	0.156 25	0.039	0.75	相加
铜绿假单胞菌(ATCC 27853)	80	0.312 5	0.156 25	0.156 25	0.039	0.75	相加
肺炎克雷伯菌(20140123)	10	0.156 25	0.039	0.312 5	0.156 25	0.75	相加

表3 大蒜素及盐酸小檗碱对耐药菌的抗菌作用

Tab. 3 Antibacterial effects of DATS and BBH against drug-resistance bacterium

受试菌株	阳性药物/(U·mL <sup>-1</sup> )	大蒜素/(mg·mL <sup>-1</sup> )		盐酸小檗碱/(mg·mL <sup>-1</sup> )		FICI	作用方式
		单用	联用	单用	联用		
ESBLs(201406241)	640	0.312 5	0.156 25	0.156 25	0.078 125	1	相加
MRSA(201406242)	320	1.25	0.625	0.156 25	0.039	0.75	相加

素钠对耐药菌 MRSA 的 MIC 值为质控菌金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)的128倍,然而在相同的条件下大蒜素为2倍,盐酸小檗碱为1倍。所以,大蒜素及盐酸小檗碱比阳性药物对耐药菌的抑制作用强<sup>[19]</sup>。

3.2 24 h 时间—杀菌曲线 大蒜素对大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、ESBLs 及 MRSA 的 24 h 时间—杀菌曲线随着剂量的增加,呈现出剂量依赖特性(图1)。盐酸小檗碱对4株菌株也显示了相同的剂量依赖性(图2)。大蒜素和盐酸小檗碱在细菌生长的24 h内,对前4 h细菌生长有明显的抑制作用,说明大蒜素和盐酸小檗碱对对数生长期的细菌有抑制作用。但是,当大蒜素及盐酸小檗碱单独应用时,在4×MIC下对4株试验菌株在培养至24 h时不能看出抑菌或者杀菌效果,这种抑菌趋势与文献报道类似<sup>[20]</sup>。

当两药联用时,随着两药质量浓度的增加,出现杀菌效果:对大肠埃希菌(ATCC 25922),1×MIC BBH + 1×MIC DATS 在8 h时引起细胞死亡达到杀菌效果;对金黄色葡萄球菌(ATCC 29213),1×MIC BBH + 1×MIC DATS 在8 h时也引起细胞死亡达到杀菌效果;对ESBLs,1×MIC BBH + 2×MIC DATS 在12 h时也引起细胞死亡达到杀菌效果;对MRSA,2×MIC BBH + 1×MIC DATS 在12 h时也有相同的杀菌效果(图3)。此外,两药联用在24 h点时,1/4×MIC BBH + 1/2×MIC

DATS 对大肠埃希菌(ATCC 25922)相对于抑菌活性较强的单药下降2.57 log<sub>10</sub> CFU/mL,为协同作用;1/4×MIC BBH + 1/2×MIC DATS 对金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)相对于抑菌活性较强的单药下降2.06,为协同作用;1/2×MIC BBH + 1/4×MIC DATS 对ESBLs相对于较抑菌活性较强的单药下降1.86,为相加作用;1/4×MIC BBH + 1/2×MIC DATS 对MRSA相对于抑菌活性较强的单药下降1.08,为相加作用(图4)。

#### 4 讨论

综上所述,由于抗生素的滥用等导致很多细菌耐药,给人类健康造成了严重的威胁。细菌耐药及耐药菌所引起的一系列慢性疾病,成为了现代公共卫生面临的问题之一。寻找低毒有效的抗菌药物是医药研究关注的焦点。目前,由于许多中草药成分具有低毒且温和的抗菌效果,同时还能够逆转耐药菌的耐药性,从中草药中寻找抗菌药物成为了热点<sup>[21]</sup>。大蒜素及盐酸小檗碱是从天然药物中发现的两种药物,具有广谱抗菌作用并且已用于临床。

文献报道<sup>[22]</sup>,盐酸小檗碱对革兰氏阳性菌及耐药菌有良好的抑菌效果,本研究与其相符。同时结果显示,大蒜素对革兰氏阴性菌有良好的抑菌效果。此外,有报道显示<sup>[23]</sup>,大蒜素对幽门螺旋杆菌被膜的杀菌作用是通过其挥发性和脂溶性,穿透细菌的细胞生物膜,从而破坏和摧毁其细胞<sup>[24]</sup>。可以发现大蒜素和盐酸小檗碱这两种化合物,一种

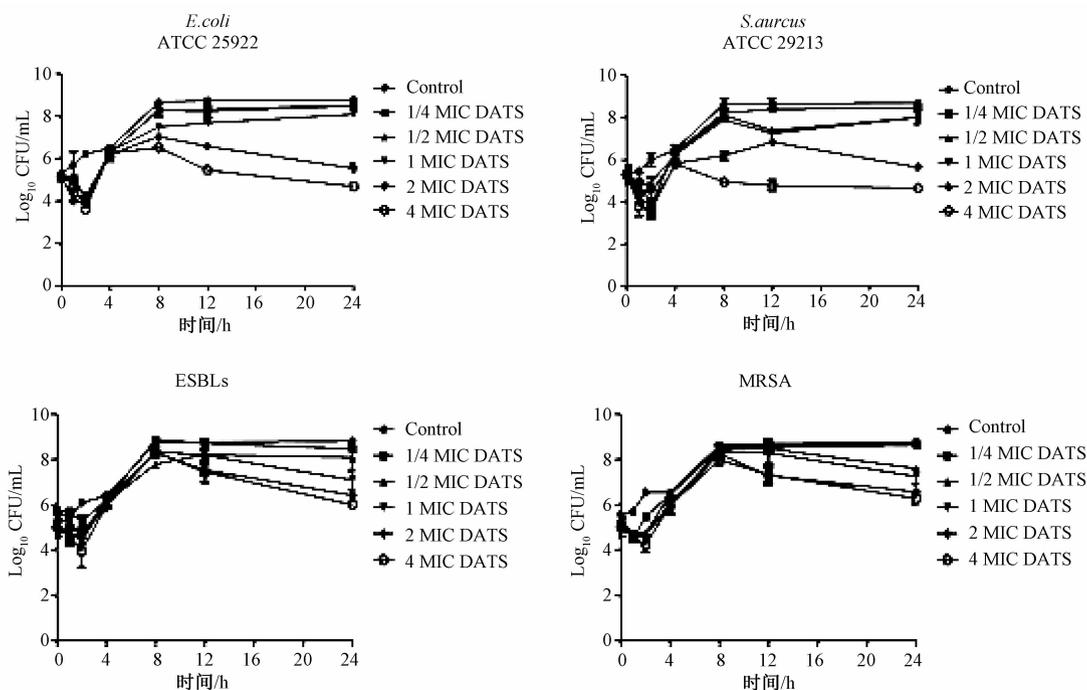


图1 大蒜素对试验菌株的时间—杀菌曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 1 Time-kill curves of DATS against tested strains ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

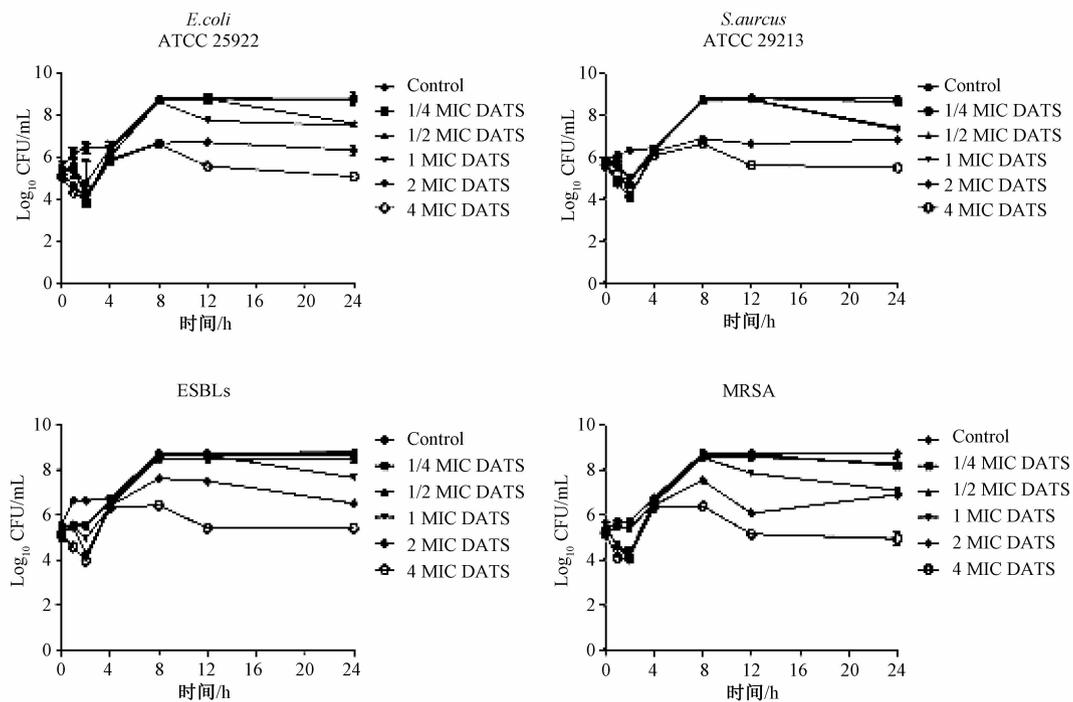


图2 盐酸小檗碱对试验菌株的时间—杀菌曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Time-kill curves of BBH against tested strains ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

为脂溶性挥发性硫醚，一种为水溶性生物碱，在理化性质上有互补的作用。此外，大蒜黄连丸这一古方在我国古代已成功应用，大蒜素和盐酸小檗碱为

其主要的成分，我们推测认为将两药联合可能提高其抗菌活性，这是我们探索研究本课题的目的。

研究表明，单独应用大蒜素及盐酸小檗碱对

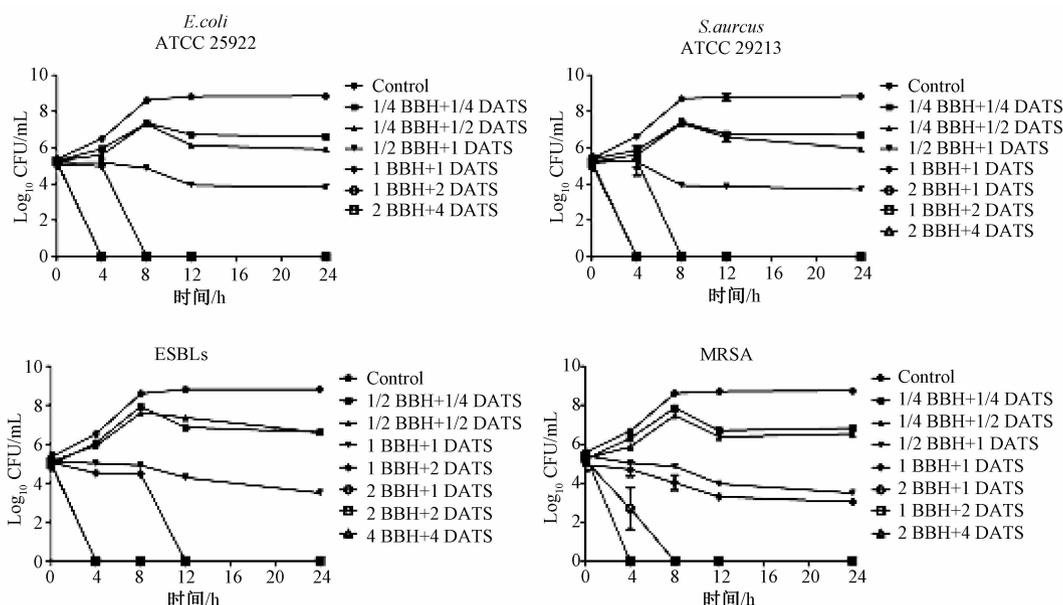


图3 大蒜素与盐酸小檗碱联合的时间-杀菌曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Time-kill curves of DATS and BBH in combination against tested strains ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

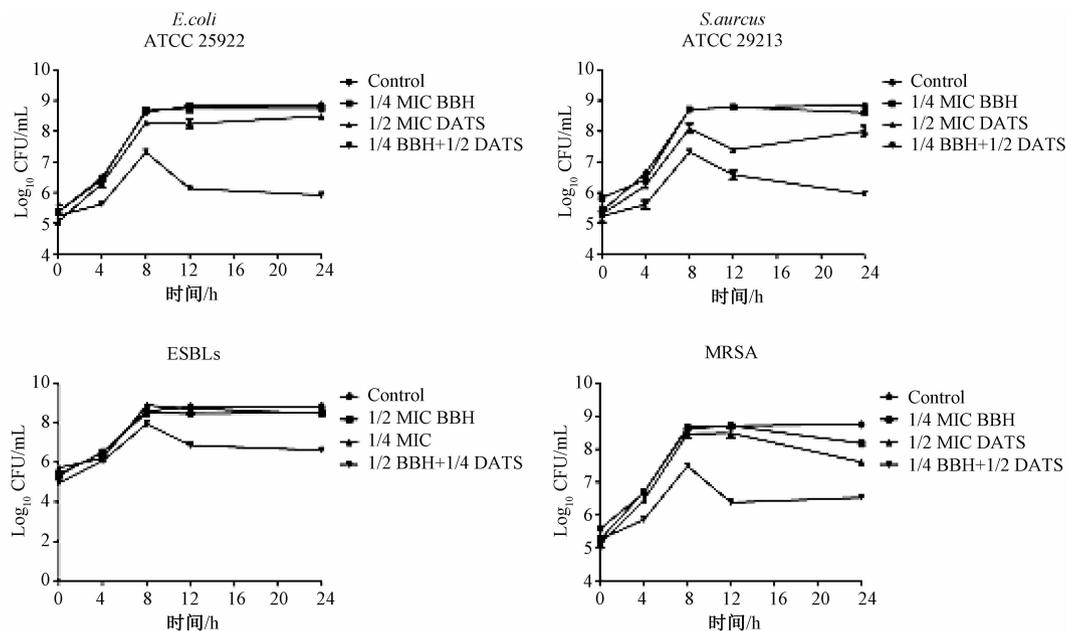


图4 大蒜素与盐酸小檗碱单独及联合的时间-杀菌曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Time-kill assay of the two drugs alone and in combination against tested strains ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

试验菌株具有抑菌活性，但即使达到  $4 \times \text{MIC}$ ，在 24 h 培养下没有显示杀菌作用。然而两药联用时，在 24 h 培养下以相对较低质量浓度显示出杀菌作用，且在亚 MIC 下具有弱协同或者相加的联合作用。

本研究采用棋盘法及 24 h 杀菌曲线法评价两药联用效应时，得出的结果基本一致，个别处略有

不同。这是由于两种评价方法在算法上不一致所致<sup>[25]</sup>。

总之，本研究显示大蒜素和盐酸小檗碱联合应用时对供试的敏感菌株及耐药菌株（ESBLs 及 MRSA）显示出了较好的杀菌作用。此外，本研究还需要进行更多的临床耐药菌株抑菌试验及其体内药效评价。

参考文献:

[ 1 ] Tsao S M, Yin M C. *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47(5): 665-670.

[ 2 ] Wu C C, Sheen L Y, Chen H W, *et al.* Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats [J]. *J Agric Food chem*, 2002, 50(2): 378-383.

[ 3 ] Li X, Yue Y, Zhou Y, *et al.* An oil-free microemulsion for intravenous delivery of diallyl trisulfide; formulation and evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2011, 407(1-2): 158-166.

[ 4 ] 徐小江, 肖文军, 陈 庆, 等. 大蒜素抗菌作用及其机制 [J]. *医药导报*, 2010, 29(8): 1048-1051.

[ 5 ] Davis S R. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products—the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic [J]. *Mycoses*, 2005, 48(2): 95-100.

[ 6 ] Zhen H, Fang F, Ye D Y, *et al.* Experimental study on the action of allitridin against human cytomegalovirus *in vitro*; inhibitory effects on immediate-early genes [J]. *Antiviral Res*, 2006, 72(1): 68-74.

[ 7 ] Ball A R, Casadei G, Samosorn S, *et al.* Conjugating berberine to a multidrug efflux pump inhibitor creates an effective antimicrobial [J]. *ACS Chem Biol*, 2006, 1(9): 594-600.

[ 8 ] Amagase H, Petesch B L, Matsuura H, *et al.* Intake of garlic and its bioactive components [J]. *J Nutr*, 2001, 131(3): 955S-962S.

[ 9 ] 武 佳, 谭桂莲, 杨 红. 黄连中盐酸小檗碱提取工艺研究 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(2): 429-430.

[10] Sowbhagya H B, Purnima K T, Florence S P, *et al.* Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil [J]. *Food Chem*, 2009, 113(4): 1234-1238.

[11] National committee for clinical laboratory standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M7-A5 [S]. Pennsylvania: NCCLS, 2000.

[12] 徐淑云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1658-1659.

[13] Hu Z Q, Zhao W H, Asano N, *et al.* Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(2): 558-560.

[14] Orhan G, Bayram A, Zer Y, *et al.* Synergy tests by E test and chequerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 140-143.

[15] Chang S C, Chen Y C, Luh K T, *et al.* *In vitro* activities of antimicrobial agents, alone and in combination, against *Acinetobacter baumannii* isolated from blood [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1995, 23(3): 105-110.

[16] Chin J N, Jones R N, Sader H S, *et al.* Potential synergy activity of the novel ceragenin, CAS-13, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant *P. Aeruginosa* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(2): 365-370.

[17] Sahuquillo J M, Colombo E, Gil A, *et al.* *In vitro* activity of linezolid in combination with doxycycline, fosfomicin, levofloxacin, rifampicin and vancomycin against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* [J]. *Rev Esp Quimioterap*, 2006, 19(3): 252-257.

[18] 马玉璞, 赵 雯, 王汝涛, 等. 注射用青霉素钠与脂肪乳的配伍稳定性及体外抑菌活性检测 [J]. *中国药业*, 2012, 21(16): 35-37.

[19] 杭永付, 薛晓燕, 方 芸, 等. 中药抗菌和逆转耐药作用机制 [J]. *中国药房*, 2011, 22(47): 4504-4507.

[20] Manuela D, Giovanna G, Giuseppina M, *et al.* Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(5): 317-322.

[21] Hemaiswarya S, Kruthiventi A K, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infection diseases [J]. *J Phytomedicine*, 2008, 15(8): 639-652.

[22] 杨 勇, 叶小利, 李学刚. 4种黄连生物碱的抑菌作用 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(12): 3013-3014.

[23] 刘 伟, 于 晗, 李玉塘, 等. 大蒜素对幽门螺旋杆菌的杀菌作用 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2013, 51(10): 49-53.

[24] Lu X, Samuelson D R, Rasco B A. Antimicrobial effect of diallyl sulphide on *Campylobacter jejuni* biofilms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(138): 1915-1926.

[25] 罗 非, 韩念霖, 韩济生. 关于药物协同作用的几种计算方法 [J]. *生理科学进展*, 1995, 26(3): 276-280.