

植物活性成分协同抗生素消减细菌耐药性的研究进展

陈金玉¹, 刘单阳¹, 赵勇^{1,2,3}, 孙晓红^{1,2,3}*¹上海海洋大学食品学院; ²农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海);³上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

摘要:细菌耐药性问题给人类生命安全带来了前所未有的挑战。常用抗生素对某些耐药性细菌的治疗作用逐渐减弱甚至无效,开发新型化学合成抗菌剂成本高、耗时长、难度大。以植物活性成分如生物碱类、多酚类、萜类、凝集素、皂甙类、硫代葡萄糖苷等化合物为基础的抑菌剂不仅在抗菌等方面具有巨大的潜力,还可以通过多种途径与抗生素发挥协同抗菌作用。本文综述了细菌耐药现状以及植物活性成分协同抗生素对耐药菌的作用及其机制,以期恢复或增强耐药菌对现有抗生素的敏感性,为植物活性成分在消减细菌耐药性的应用领域提供理论基础。

关键词:植物活性成分;抗生素;细菌耐药性;抗菌活性;协同作用

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)6-1063-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.6.021

Research progress on the synergistic effects between plant active ingredients and antibiotics to reduce drug resistance of bacteria

CHEN Jin-yu¹, LIU Dan-yang¹, ZHAO Yong^{1,2,3}, SUN Xiao-hong^{1,2,3}*¹College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University;²Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture;³Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China

Abstract: The problem of bacterial resistance has brought an unprecedented challenge to human life. The common antibiotics have been gradually weakened or even become ineffective in the treatment of drug-resistant bacteria. The development of new antibiotics is costly, time-consuming, and difficult. Antimicrobial agents based on plant active ingredients such as alkaloids, polyphenols, terpenoids, lectins, saponins, glucosinolates and other compounds not only have great potential in antibacterial activity, but also play a synergistic antibacterial role with antibiotics in various ways. In this paper, we summarize the research status of bacterial resistance, the effect of plant active ingredients on drug-resistant bacteria and the mechanism of synergistic antibacterial action with antibiotics, which could restore or enhance the sensitivity of drug-resistant bacteria to existing antibiotics, and provide theoretical basis for the application of plant active ingredients in the field of counteracting bacterial resistance.

Key words: plant active ingredients; antibiotics; bacterial resistance; antibacterial activity; synergism

抗生素是二十世纪初医学上最伟大的发现之一,并被广泛用于传染性疾病的治疗。但是随着抗生素的长期和不合理使用,大多数易感细菌对抗生素产生了耐药性。一旦细菌对某些抗生素产生耐药性,不仅能够通过基因垂直转移将这种特性遗传给子代,还能通过水平基因转移传递给其他细菌。耐药细菌的遗传结构变化非常之快,以至于普通抗生

素的有效性可能会在5年内丧失^[1]。当前面对细菌耐药性带来的挑战,全球主要的应对策略有:加强耐药监测、合理使用抗生素、开发新型抗菌药物和恢复或增强现有抗生素的抗菌活性等^[2]。新药的开发和实施是一个困难、耗时、昂贵的过程,并且新药研发跟不上细菌耐药性的变化^[3]。截至目前,成功研发出新药物这一目标还远未实现。因此,恢复或增强耐药菌对现有抗生素的敏感性是控制细菌耐药性持续发展的有效措施。

植物活性成分具有抗菌、抗氧化、抗炎等功效,

收稿日期:2020-09-22

接受日期:2021-01-20

基金项目:上海市科技农重点攻关项目(2019-02-08-00-10-F01149)

*通信作者 Tel:86-21-61900503; E-mail: xhsun@shou.edu.cn

还具有不易产生耐药性、体内代谢快、低毒无残留等优点^[4,5]。植物活性成分单独使用或与抗生素联合使用均具有广泛的抗菌作用,与抗生素合用能有效恢复或增强现有抗生素对耐药菌的抗菌活性,为消减细菌耐药性提供一种新的策略。本文对细菌耐药现状、植物活性成分协同抗生素对耐药菌的作用及其机制进行综述,旨在为植物活性成分在消减细菌耐药性的应用领域提供理论基础。

1 细菌对抗菌药物的耐药现状

细菌耐药性主要分为固有耐药性和获得耐药性两大类,固有耐药性是细菌与生俱来的,由染色体基因决定,细菌在进化过程中为了适应抗生素的存在或者代谢抗生素导致自身编码蛋白质的普通基因(也称为耐药基因)被激活,并且永久性的遗传给后代。获得耐药性是指细菌多次与抗菌药物接触后,为了适应生存环境,遗传基因发生突变、代谢途径改变,对抗生素的敏感性降低,从而产生耐药性^[6]。由于抗生素的不合理使用和滥用,加速了细菌耐药性的发展,耐药菌株不断增多,耐药水平不断增强,耐药谱逐渐扩大,细菌逐步发展成为单一耐药菌、多药耐药菌甚至全耐药菌。现如今,细菌耐药问题在全球范围内普遍存在,多药耐药菌及全耐药菌的检出率居高不下^[7]。根据世界卫生组织(WHO)的报告,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和链球菌等已成为欧美地区最常见的医院内感染和耐药菌株,感染率高达50%,每年至少造成5万人死亡^[8,9]。据美国疾病控制和预防中心(CDC)估计,如果耐药性水平持续上升,到2050年每年将导致1000万人死亡^[10]。中国细菌耐药性监测网(CHINET)数据表明,2005~2020年我国大多数的临床分离菌株对常见抗菌药物的耐药率依然呈现递增趋势,革兰氏阴性菌的耐药率均呈现上升趋势,且对碳青霉烯类抗生素的耐药情况日益加重。其中肺炎克雷伯氏菌对亚胺培南的耐药率从3.0%增长至26.4%,对美罗培南的耐药率从2.9%上升至28.0%。此外,不动杆菌和铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药率分别达到了76.7%和29.2%,对美罗培南的耐药率分别为76.1%和24.5%^[11]。

相比于抗生素在人类临床上的过量使用,应用于动物的抗生素数量更加惊人。我国每年生产抗生素21万吨,其中大约有54%用于饲养动物^[12]。世界动物卫生组织(OIE)公布的数据显示,食品动物消耗的抗生素约占全球生产抗生素总量的50%,而

我国食品动物生产中抗生素的使用量达到了30%,高居全球榜首^[13]。我国养殖使用的全部抗生素总量约为 2.98×10^4 t,所用抗生素主要分为促生长和治疗2大类,其中,促生长使用方式的用量为 1.54×10^4 t,至少占全部使用的兽用抗生素比重达53%。据保守估计,2010~2030年,应用于中国畜牧业的抗生素总量至少增加一倍,约达到全球消耗总量的1/3^[14]。畜牧业和水产养殖业为了预防传染病、促进生长及提高饲料转化率,在动物饲料中长期过量添加抗生素,导致细菌产生耐药性^[15]。细菌耐药性不仅对动物健康有影响,而且也严重威胁公共卫生,因为过度使用抗生素、加强动物生产系统和全球化之间的联系,动物源耐药菌可通过土壤排泄物、水环境、空气以及食物链等将耐药基因转移给人体病原菌,导致人源性细菌产生耐药性,从而导致临床治疗效果减弱。此外,耐药基因的水平转移不仅增加了在不同生态系统之间传播多药耐药性细菌的风险,还严重威胁着畜牧业发展、人类生命健康、国家经济和全球安全^[16,17]。

由于抗生素在临床和养殖业的广泛使用,导致细菌耐药问题日益加重,甚至出现了超级细菌。超级细菌可携带一种或多种耐药基因,并且能通过质粒和转座子等将耐药基因在不同菌属之间传播。此外,它还可以水解几乎所有的 β -内酰胺类抗生素,包括被称为“抗生素最后防线”的碳青霉烯类,从而导致抗生素的治疗毫无效果,感染者死亡率大幅度增加,住院时间延长,住院率升高,治疗费用增加,甚至还会陷入“无药可医”的窘境^[18]。继2009年首次报道了第一个轰动全球的携带新德里金属 β -内酰胺酶(NDM-1)的超级耐药葡萄球菌后,2020年美国疾病控制和预防中心(CDC)又发现了两种新的超级细菌(耳念珠菌和鲍曼不动杆菌)^[19]。其出现的最可能原因是过去几十年里抗菌药物的广泛使用,尤其是抗生素的滥用导致细菌在严峻的生存压力下发生适应性突变。此外,细菌极强的进化和变异能力导致新的耐药机制产生,因此,即使在各国严格的抗生素管理机制下超级细菌仍可能出现并威胁人类健康^[20]。

2 植物活性成分协同抗生素对耐药细菌的作用

2.1 生物碱类

生物碱是植物中普遍存在的一种活性物质,单独或者与抗生素联合使用能对多种耐药菌发挥抗菌作用。生物碱与不同种类抗生素联合作用后能显著

增强抗生素对多药耐药革兰氏阴性菌的抗菌作用。Laudadio 等^[21]研究发现,小檗碱联合妥布霉素对多药耐药铜绿假单胞菌(multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MRPA)具有较强的抑菌效果,与单独使用妥布霉素相比在 24 h 内活细胞数减少至少 2 log。Jaktaji 等^[22]发现,从槐花中提取的槐花总碱(1.56 mg/mL)和环丙沙星(1.00 mg/mL)联用对外排泵基因 *acrAB* 过表达的多药耐药大肠杆菌存在协同抗菌作用,分数抑制浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)为 0.13,环丙沙星最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)降低了 2.8 倍,增强了耐药菌对抗生素敏感性。此外,生物碱与抗生素对革兰氏阳性菌也能发挥协同抗菌作用,Mgbeahuruike 等^[23]研究发现,胡椒碱单独使用可以抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),与四环素联用时 FICI 的值为 0.3,能有效恢复 MRSA 对四环素的敏感性。Zuo 等^[24]研究表明,黄连素能增强 β -内酰胺类抗生素对 MRSA 的抗菌活性,这种明显的协同作用表现为降低了抗生素的最低有效剂量,能最大程度地减少药物的副作用。

2.2 黄酮类

黄酮类化合物广泛存在于蜂蜜、水果、种子、蔬菜等多种植物及植物产品中,与多种抗生素联合使用均能表现出对 MRSA 的协同抑制作用,Amin 等^[25]研究显示,木犀草素、槲皮素两种黄酮类化合物与头孢曲松、亚胺培南合用对 MRSA 的 FICI 值为 0.45~0.50,其它 β -内酰胺类抗生素的 MIC 值也降低了 2~16 倍,表明上述两种黄酮类化合物能不同程度地增强 β -内酰胺类抗生素对 MRSA 的抗菌作用。Diniz-Silva 等^[26]发现,杨梅素、橙皮苷、根皮苷等多种黄酮类化合物与诺氟沙星联用均对 MRSA 有一定的协同抗菌作用,诺氟沙星的 MIC 值与单独使用时相比下降了 4~16 倍。黄酮类化合物联合抗生素对耐药菌具有广谱协同抗菌活性,不仅能消减 MRSA 的耐药性,还能调节多药耐药分枝杆菌的抗生素抗性^[27]。Marini 等^[28]将亚抑制浓度的姜黄素与阿米卡星、克拉霉素、环丙沙星和利奈唑胺联合作用,结果显示它们对多药耐药分枝杆菌的 FICI 值分别为 0.187 5、0.250 0、0.375 0 和 0.257 8,四种抗生素的 MIC 值也降低了 4~128 倍,表明姜黄素在很大程度上消减了多药耐药脓肿分枝杆菌对常用抗生素的耐药性,是具有广阔应用前景的抗菌协同剂。

2.3 多酚类

多酚类化合物主要由黄酮、酚酸、醌、单宁和香豆素等物质组成,与氨基糖苷类抗生素联合应用对多重耐药革兰氏阳性和革兰氏阴性菌均有较强的协同抗菌作用。Parvez 等^[29]研究发现,表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)与庆大霉素联用能降低庆大霉素对多药耐药大肠杆菌(multidrug-resistant *Escherichia coli*, MREC)和金黄色葡萄球菌的 MIC 值至少 5 倍,EGCG 与庆大霉素联合使用对两种多药耐药菌的 FICI 值均为 0.325,呈现出协同抗菌作用。多酚与四环素类抗生素联合也具有消减细菌耐药性的作用。Maisuria 等^[30]研究发现,通过将蔓越莓原花青素与四环素联合使用,能将四环素对 MREC、MRPA 的 MIC 值分别降低 128 倍和 32 倍,表明对多数多药耐药革兰氏阴性菌均具有一定程度的协同抗菌活性。此外,多酚与利福平联用也能呈现出对多药耐药分枝杆菌的协同抗菌效果。Solnier 等^[31]发现,利福平与黄芩总黄酮联合使用后 MIC 值降低了 8 倍,黄芩总黄酮不仅能显著降低分枝杆菌对利福平的耐药水平,还能增强抗生素的抗菌活性,具有潜在的消减耐药性的功效。

2.4 萜类

萜类是植物精油的主要成分,具有抗菌作用。萜类化合物与 β -内酰胺类、喹诺酮类抗生素联用对肺炎克雷伯氏菌和大肠杆菌具有协同抗菌作用。Dhara 等^[32]测试肉桂醛与不同种类抗生素联用对 61 株(28 株大肠杆菌,33 株肺炎克雷伯氏菌)多药耐药临床分离株的耐药性的消减作用时发现,肉桂醛与头孢噻肟联合应用能对 75.0% 的大肠杆菌和 60.6% 的肺炎克雷伯氏菌发挥协同作用。类似的,在 39.6% 的大肠杆菌和 42.4% 的肺炎克雷伯氏菌中也能观察到肉桂醛与环丙沙星之间的协同作用。另外,肉桂醛可使头孢噻肟和环丙沙星的 MIC 降低 2~1 024 倍,显著增强了多药耐药大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌对这两类抗生素的敏感性。Mohamed 等研究^[33]证实,百里香酚和薄荷醇与环丙沙星合用也具有逆转肺炎克雷伯氏菌耐药性的作用,可最大程度地减少所使用的抗生素浓度,大幅度地降低潜在的毒副作用。

2.5 其它类化合物

植物中的其它次生代谢物,如凝集素、硫代葡萄糖苷、多糖等均具有广泛的抑菌活性,因此可将植物活性成分与抗生素混合后发挥协同抗菌作用。San-

tos 等^[34]通过将紫丁香凝集素与庆大霉素按最佳比例混匀后注射小鼠体内连续治疗 10 天后发现,紫丁香凝集素能增强庆大霉素对 MRSA、MREC 的抗菌活性并提高小鼠存活率,庆大霉素对 MREC 和 MRSA 的 MIC 值分别降低 3 倍和 5 倍。芥子油苷对多药耐药幽门螺杆菌具有较强的抗菌活性,与万古霉素、苯唑西林等抗生素联用能有效提高 MRSA 对甲氧西林的敏感性^[35]。Zhai 等^[36]通过在南美白对虾饲料中添加单一的黄芪多糖、氟苯尼考和两者混合物,记录 5 天内虾的死亡率。结果显示,混合组的累

积死亡率显著低于单独使用黄芪多糖或氟苯尼考组,黄芪多糖与氟苯尼考合用能对副溶血性弧菌发挥协同抗菌作用,减少渔药的投入成本,降低耐药性的发生率。

3 植物活性成分与抗生素协同抗菌的作用机制

植物活性成分可以通过改变抗生素的目标靶点、抑制抗生素水解/修饰酶的活性、促进膜的渗透性/抑制外排泵的活性等途径恢复或者增强抗生素对耐药菌的抗菌活性。不同种类的植物活性成分和抗生素协同抗菌的作用机制如表 1 所示。

表 1 植物活性成分与抗生素协同作用

Table 1 Synergistic interactions of plant active ingredients with antibiotics

作用机制 Mechanism of action	作用方式 Mode of action	细菌靶点 Bacterial target	植物活性成分 Active ingredients of plant	抗生素种类 Type of antibiotics	参考文献 Ref.
改变抗生素的目标靶点 Changing the target of antibiotics	PBP2a 形成量 ↓	MDR 金黄色葡萄球菌	香豆素 Coumarin	氨基糖苷类、四环素类	37
		MRSA	桑黄乙酸乙酯 <i>Phellinus baumii</i> ethyl acetate	β-内酰胺类	38
抑制抗生素水解/修饰酶的活性 Inhibition of antibiotic hydrolysis/ modification enzyme activity	β-内酰胺酶 ↓	ESBL-QR 大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌	肉桂醛 Cinnamaldehyde	β-内酰胺类、喹诺酮类	32
		MDR 大肠杆菌	裸麦角碱 Chanoclavine	四环素类	39
		MRSA	木犀草素 Luteolin	β-内酰胺类、氨基糖苷类	25
			黄芩苷 Baicalin	β-内酰胺类	40,41
			单宁酸 Tannic acid		
		MDR 革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌	香芹酚 Carvacrol	四环素类	42
			百里香酚 Thymol		
			MDR 金黄色葡萄球菌	胡椒素 Piperlongumine	四环素类、利福平
	MDR 肺炎克雷伯氏菌	薄荷醇 Menthol	喹诺酮类	32	
	细胞膜通透性 ↑	MRSA	黄连素 Berberines	β-内酰胺类	23
			没食子酸 Gallic acid	氨基糖苷类	43
		MDR 大肠杆菌、沙门氏菌	金合欢油 <i>Acacia</i> oil	β-内酰胺类、四环素类	44
	生物膜形成 ↓	MDR 脓肿分枝杆菌	姜黄素 Curcumin	氨基糖苷类、喹诺酮类	28
		MRSA、VR 肠球菌	槲皮素 Quercetin	β-内酰胺类、氨基糖苷类	45
		MDR 铜绿假单胞菌	芦丁 Rutin	氨基糖苷类	46
促进膜的渗透性/抑制外排泵的活性 Promoting membrane permeability/ inhibiting efflux pump activity		MDR 革兰氏阴性菌	蔓越莓原花青素 Cranberry proanthocyanidin	四环素类	30

续表 1 (Continued Tab. 1)

作用机制 Mechanism of action	作用方式 Mode of action	细菌靶点 Bacterial target	植物活性成分 Active ingredients of plant	抗生素种类 Type of antibiotics	参考文献 Ref.
	acrAB-TolC 外排泵 ↓	acrA 过表达大肠杆菌	槐花总碱 <i>Sophora alopecuroides</i> alkaloid	喹诺酮类	22
	MexXYOprM 外排泵 ↓	CR 铜绿假单胞菌	小檗碱 Berberine	碳青霉烯类	21
		MDR 铜绿假单胞菌	长春花碱 Catharanthine	氨基糖苷类、四环素类	47
	NorA 外排泵 ↓	NorA 过表达金黄色葡萄球菌	杨梅素 Myricetin	喹诺酮类	26,48
			利血平 Reserpine		
	MDR 外排泵 ↓	MDR 鲍曼不动杆菌	EGCG	β -内酰胺类	49
		ESBL 肺炎克雷伯氏菌	咖啡酸 Caffeic acid	喹诺酮类、四环素类	50

注: ↑: 增加/激活; ↓: 减少/抑制; MRSA: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; CR: 耐碳青霉烯; MDR: 多药耐药; VR: 耐万古霉素; ESBL: 产超广谱 β -内酰胺酶; ESBL-QR: 产超广谱 β -内酰胺酶且耐喹诺酮类; PBP2a: 青霉素结合蛋白; EGCG: 表没食子儿茶素没食子酸酯。

Note: ↑: Increase/activate; ↓: Decrease/inhibit; MRSA: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; CR: Carbapenem-resistant; MDR: Multidrug resistant; VR: Vancomycin-resistant; ESBL: Extended spectrum β -lactamases; QR: Quinolone-resistant; PBP2a: Penicillin binding protein 2a; EGCG: Epigallocatechin gallate.

3.1 改变抗生素的目标靶点

抗生素目标靶位的突变是细菌产生耐药性的重要机制之一,细菌可以通过产生替代靶点(如酶或受体)与抗生素结合从而导致抗生素的抗菌活性降低^[51]。青霉素结合蛋白(PBPs)是细菌细胞壁的重要组成部分,MRSA 能产生由 *mecA* 基因编码的替代青霉素结合蛋白(PBP2a),降低对 β -内酰胺类抗生素的亲合力,从而呈现出高度耐药性。植物活性成分可抑制细菌产生 PBP2a 并增强抗生素与 PBPs 的结合能力,提高 β -内酰胺类抗生素的抗菌活性。Hong 等^[38]研究发现,1/4 MIC、1/2 MIC 浓度的桑黄乙酸乙酯能分别将 MRSA 的 PBP2a 产生量降低 25.50% ~ 73.66%、0% ~ 4.56%。桑黄乙酸乙酯对 PBP2a 的产生量呈现出浓度依赖性降低,表明其对 PBP2a 产生量的抑制作用是主要协同机制。香豆素^[37]以及苦丁多酚^[52]都能下调 *mecA* 基因的表达,从而抑制细胞壁中 PBP2a 的合成或降低 PBP2a 的活性,增强 β -内酰胺类抗生素与 PBPs 的结合活性,恢复 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素的敏感性。

3.2 抑制抗生素水解/修饰酶的活性

细菌对抗生素耐药的重要因素之一是产生 β -内酰胺酶,这种酶可催化青霉素、头孢菌素和其他 β -内酰胺类抗生素的水解,导致抗生素失活^[53]。植物活性成分可通过抑制 β -内酰胺酶活性恢复抗生素对细菌的杀菌作用。Cao^[54]通过紫外分光光度法测定 15 种中药单体对 ESBL 大肠杆菌产生的 β -内

酰胺酶活性的抑制作用时发现,芦荟大黄素、槲皮素、香紫苏醇、木犀草素、苦参碱、大蒜素和五味子甲素 7 种中药单体对 β -内酰胺酶有一定的抑制作用,其中抑制效果最佳的为芦荟大黄素(90 $\mu\text{g}/\text{mL}$),其抑酶率高达 81.7%;苦参碱次之(90 $\mu\text{g}/\text{mL}$),其抑酶率为 71.7%,不同程度的增强了 ESBL 大肠杆菌对 β -内酰胺类抗生素的敏感性。Lee 等^[49]通过研究 EGCG 与 β -内酰胺类抗生素联合对 70 株 MDR 鲍曼不动杆菌的协同作用时发现,亚抑制浓度的 EGCG 能使 β -内酰胺类抗生素对 MDR 鲍曼不动杆菌的 MIC 下降 2 ~ 512 倍,EGCG 对 β -内酰胺酶的抑制率与对照组相比提高了 21.7%。表明 EGCG 能通过抑制 β -内酰胺酶活性显著增强 β -内酰胺类抗生素的抗菌活性。此外,还有研究表明,香豆素^[37]、槲皮素^[45]、单宁酸^[41]等多酚类化合物均能降低抗生素的 MIC 值,增强 β -内酰胺类抗生素对 MRSA 的抗菌作用,它们的作用机制可能也是抑制了 β -内酰胺酶的活性。

3.3 促进膜的渗透性/抑制外排泵的活性

细菌可以通过阻止抗生素进入细胞或以比其流入更快的速度将其泵出细胞来干扰抗生素作用,从而导致抗生素活性降低并产生耐药性。研究发现,植物活性成分能通过促进膜渗透性、抑制外排泵活性来消减细菌耐药性。

3.3.1 改变膜的渗透性

细菌可通过减少孔蛋白的生成量、改变孔蛋白

的结构、增加细胞壁的厚度等方式降低细胞膜的通透性,导致抗生素通过菌体外膜进入胞内的量减少,进而对抗生素产生耐药性^[53]。植物活性成分能分解革兰氏阴性菌的油性外膜并增加膜的通透性,当其不能以高浓度到达胞内与疏水性抗生素结合时就会增强细胞膜的渗透性,同时导致细胞内抗生素浓度增加,从而增强抗菌作用。Dhara 等^[32]通过扫描电镜观察肉桂醛与头孢他啶、环丙沙星联合对 ES-BL-QR 大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌细胞膜结构的影响,发现联合作用 6 h 后细胞质膜破裂、细胞质流失。研究促进孔蛋白基因(*ompC*、*ompF*、*ompK35* 和 *ompK36*)转录水平发现,促进孔蛋白基因转录水平的增加提高了细菌细胞膜的渗透性,促进抗生素流入细胞内,呈现出明显的协同抗菌作用。植物活性成分对革兰氏阳性菌细胞膜的通透性也具有增强作用。Amin 等^[25]发现木犀草素和阿莫西林联合使用时也可破坏细菌细胞膜的完整性,使其通透性增加, K^+ 外泄,从而导致 MRSA 细胞数量的减少。此外, Akilandeswari 等^[55]通过紫外分光光度法测量 MRSA 在 260 nm 处细胞裂解后释放的细胞内容物的吸光度和在 590 nm 处结晶紫进入 MRSA 细胞膜的百分比,发现芹菜素与 β -内酰胺类抗生素联合能破坏 MRSA 细胞质膜并导致细胞内容物泄漏,提高细胞膜的通透性,从而协同抑制 MRSA 的生长、消减其耐药性。

3.3.2 抑制/清除生物被膜

生物被膜是粘附在细胞表面的一种胞外聚合物,阻碍抗生素进入细胞内,是细菌产生耐药性的一个重要因素^[56]。植物活性成分能抑制细菌生物被膜的生成或者清除已形成的成熟生物被膜,提高抗生素的渗透率,进而使细菌对抗生素重新敏感。Abu El-Wafa 等^[57]在研究植物活性成分和不同种类抗生素联用对 MRPA 生物被膜的影响时发现,石榴和迷迭香提取物单独使用对 MRPA 生物被膜的抑制率分别为 91.93%、90.83%,与头孢他啶(0.002 mg/mL)和庆大霉素(0.002 mg/mL)联合对成熟生物被膜的清除率分别为 97.3%~99.6%、4.3%~98.3%。表明石榴和迷迭香提取物能通过抑制或清除生物被膜与抗生素协同抗菌。Deepika 等^[46]报道称,将 1/2 MIC(200 μ g/mL)芦丁与 1/4 MIC(2.5 μ g/mL)庆大霉素联合作用对 MRPA 的生物被膜清除率为 85%,显著增强了庆大霉素的抗生物被膜活性。此外,木犀草素^[25]、槲皮素^[45]、黄芩苷^[40]等黄

酮类活性化合物均能显著抑制 MRSA 生物被膜的形成,对于 MRSA 的耐药性发挥消减作用,使 MRSA 对抗生素重新敏感。

3.3.3 抑制外排泵活性

外排泵是细菌细胞膜上存在的一类能将抗生素等细胞内容物泵出胞外的蛋白质系统,是细菌耐药的重要机制之一^[47]。植物活性成分能通过抑制外排泵活性这一途径提高耐药菌对抗生素的敏感程度。康丝碱(甾体生物碱)能抑制铜绿假单胞菌中的 MexAB-OprM 外排泵活性,并恢复多种抗生素的抗菌活性^[58]。Laudadio 等^[21]研究表明,小檗碱能通过抑制 MexXY-OprM 的转录表达,从而提高铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗生素的敏感性,很大程度上增强了该类抗生素的抗菌活性。Dwivedi 等^[39]通过溴化乙锭荧光法测定外排泵活性时发现,裸麦角碱(25.0 mg/mL)与四环素(12.5 mg/mL)联用可以将 MREC 的 MDR、*TetK* 等外排基因下调至少 3.5 倍,并能通过抑制 ATP 酶活性阻断外排泵能量来源,同时还将四环素的 MIC 值降低超过了 16 倍,显示出裸麦角碱与四环素之间的协同抗菌作用。另有研究^[49]发现,EGCG 与美罗培南联用可大幅度提高 β -内酰胺类抗生素对鲍曼不动杆菌的抗菌效果,呈现明显协同作用,可能的作用机制是 EGCG 抑制了外排泵活性。Salaheen 等^[59]研究发现蓝莓和黑莓果渣提取物能通过下调外排泵基因(*norA*、*norB*、*norC*、*mdeA*、*sdrM* 和 *sepA*)2~6 倍,从而恢复甲氧西林对 MRSA 的抑菌活性。其他的天然化合物,例如利血平^[48]、辣椒素^[23]也被发现可以通过抑制金黄色葡萄球菌的 *msrA* 或 *norA* 外排基因表达,恢复 MRSA 对大多数现有抗生素的敏感性。

4 总结与展望

由于抗生素的不合理使用和过量使用,细菌的耐药问题愈发严重威胁着全球生命安全。植物活性成分,如生物碱类、多酚类、萜类等,虽然具有已知和未知的抗菌活性,但是植物活性成分单独使用发挥抗菌作用的相对周期较长,抗菌活性较弱,使用剂量也较多,可能会导致机体内化合物的蓄积引起中毒或者器官损伤。因此,在临床和动物养殖中将植物活性成分与抗生素联合应用研发成协同抗菌制剂,恢复耐药菌对抗生素的敏感性,减少抗生素和植物活性成分的使用剂量,降低抗生素和植物活性成分带来的潜在毒副作用,实现减抗降抗的战略目标。

植物活性成分可以通过改变抗生素的目标靶

点、抑制抗生素水解/修饰酶的活性、促进膜的渗透/抑制外排泵的活性等作用机制增强常规抗生素的抗菌活性,为解决细菌的耐药性问题提供了可行性的策略。尽管植物活性成分能通过不同的作用机制与抗生素协同抗菌,但是抗菌剂在人体与动物体内的代谢存在差异,且人与动物对抗菌剂的反应也不一样,植物活性成分协同医用抗生素开发成抗菌剂的标准相对更加严苛。因此,对于未来研发出的协同抗菌剂首先进行实验动物和靶动物的剂量反应(药效)、毒性和药代动力学研究,根据动物试验显示的药效作用和毒性以及药代动力学特性再进行人体临床试验研究。临床上通过药代动力学特性,半衰期长短,靶器官聚集程度,组织分布特点等评价其有效性,并通过药效学的相互作用,药动学相互作用等评价其安全性,以便协同抗菌剂在临床和动物养殖中安全、广泛的应用。将来进一步对植物活性成分与抗生素之间的协同抗菌机制进行探究并检测抗菌剂的残留,对新型、高效、安全的协同抗菌剂的研发具有重要意义。

参考文献

- 1 Ayaz M, et al. Citalopram and venlafaxine differentially augments antimicrobial properties of antibiotics [J]. *Acta Pol Pharm*, 2015, 72:1269-1278.
- 2 Chen CL, et al. Current status, harm and countermeasures of bacterial resistance [J]. *Livest Pult Ind (畜禽业)*, 2018, 29 (4):47-48.
- 3 Kuenzli E, et al. High colonization rates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in swiss travellers to south asia-a prospective observational multicentre cohort study looking at epidemiology, microbiology and risk factors [J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14:528.
- 4 Zhao NS, et al. Research progress in the determination, extraction process and biological activity of alkaloids from *Sophora moercroftiana* [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2020, 32:1614-1620.
- 5 Sanhueza L, et al. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2):e0172273.
- 6 Bi WZ, et al. Research progress on pathogenicity, drug resistance and drug resistance mechanism of bacteria [J]. *Zhejiang Med (浙江医学)*, 2018, 40:2203-2219.
- 7 Zhang J, et al. Current situation and characteristics of bacterial resistance in China [J]. *Chin J Clin Infect Dis (中华临*

- 床感染病杂志), 2016, 9:118-128.
- 8 Ballal M, et al. Emerging trends in the etiology and antimicrobial susceptibility pattern of enteric pathogens in rural coastal India [J]. *Int J Clin Med*, 2014, 5:425-432.
- 9 Wojtyczka RD, et al. Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative *Staphylococcus* strains *in vitro* [J]. *Molecules*, 2014, 19: 6583-6596.
- 10 Mendelson M. Role of antibiotic stewardship in extending the age of modern medicine [J]. *Samj S Afr Med J*, 2015, 105: 414-418.
- 11 CHINET China bacterial resistance monitoring. Monitoring results of bacterial resistance in China by CHINET in 2020 [R/OL]. [2020-09-04]. <http://www.chinets.com/Document>.
- 12 Zhang QQ, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China; source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49:6772-6782.
- 13 Wang YY, et al. Global usage of veterinary antimicrobial agents [J]. *Chin Anim Health Insp (中国动物检疫)*, 2018, 35(4):62-65.
- 14 Van Boeckel TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 5649-5654.
- 15 Li FZ, et al. Current situation of antibiotic abuse in China and countermeasures [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use (临床合理用药杂志)*, 2014, 7(26):175-177.
- 16 Wang XZ, et al. One health strategy to prevent and control antibiotic resistance [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2018, 34:1361-1367.
- 17 World Bank. Drug-resistant infections: a threat to our economic future (discussion draft) [EB/OL]. (2016-03-20) [2016-10-25]. <http://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-our-economic-future-2016>.
- 18 Thabit AK, et al. Antimicrobial-resistance; impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials [J]. *Expert Opin Pharmacol*, 2015, 16(2):159-177.
- 19 Jin WB, et al. An update on New Delhi metallo- β -lactamase-1 and its inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2020, 55:1157-1165.
- 20 Zhou T. Superbug, the threat is still there [J]. *Care Health (健康之家)*, 2019(12):24.
- 21 Laudadio E, et al. Natural alkaloid berberine activity against *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-mediated aminoglycoside resistance; *in silico* and *in vitro* studies [J]. *J Nat Prod*,

- 2019, 82:1935-1944.
- 22 Jaktaji RP, et al. Effect of total alkaloid extract of local sophora alopecuroides on minimum inhibitory concentration and intracellular accumulation of ciprofloxacin, and *acrA* expression in highly resistant *Escherichia coli* clones [J]. J Glob Antimicrob Re, 2018, 12:55-60.
- 23 Mgbeahuruike EE, et al. Antimicrobial and synergistic effects of commercial piperine and piperlongumine in combination with conventional antimicrobials [J]. Antibiotics-Basel, 2019, 8(2):55.
- 24 Zuo GY, et al. Antibacterial and synergy of berberines with antibacterial agents against clinical multi-drug resistant isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Molecules, 2012, 17:10322-10330.
- 25 Amin MU, et al. Effects of luteolin and quercetin in combination with some conventional antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11):1947.
- 26 Diniz-Silva HT, et al. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses *norA* [J]. Lwt-Food Sci Technol, 2017, 85:324-326.
- 27 Chulhwan K, et al. Interaction with polyphenols and antibiotics [J]. J Life Sci, 2017, 27:476-481.
- 28 Marini E, et al. Curcumin, an antibiotic resistance breaker against a multiresistant clinical isolate of *Mycobacterium abscessus* [J]. Phytother Res, 2018, 32:488-495.
- 29 Parvez MAK, et al. Antibacterial activities of green tea crude extracts and synergistic effects of epigallocatechingallate (EGCG) with gentamicin against MDR pathogens [J]. Heliyon, 2019, 5(7):e02126.
- 30 Maisuria VB, et al. Proanthocyanidin interferes with intrinsic antibiotic resistance mechanisms of Gram-negative bacteria [J]. Adv Sci, 2019, 6(15):1802333.
- 31 Solnier J, et al. Flavonoids as novel efflux pump inhibitors and antimicrobials against both environmental and pathogenic intracellular *Mycobacterial* species [J]. Molecules, 2020, 25(3):734.
- 32 Dhara L, et al. Cinnamaldehyde; a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae [J]. Eur J Clin Microbiol, 2020, 39(1):65-73.
- 33 Mohamed SH, et al. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. J Appl Microbiol, 2018, 125(1):84-95.
- 34 Santos VF, et al. Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces neofroprotection during antibiotic exposure [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 146:841-852.
- 35 Lim S, et al. Sulforaphene identified from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds possesses antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Funct Foods, 2016, 24:131-141.
- 36 Zhai QQ, et al. Evaluation of combination effects of *Astragalus* polysaccharides and florfenicol against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish Shellfish Immun, 2019, 86:374-383.
- 37 De Araujo RSA, et al. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* with coumarin derivatives [J]. Scientifica, 2016, 2016:6894758.
- 38 Hong SB, et al. Synergistic anti-bacterial effects of *phellinus baumii* ethyl acetate extracts and beta-lactam antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Ann Lab Med, 2016, 36:111-116.
- 39 Dwivedi GR, et al. Synergy of clavine alkaloid 'chanoclavine' with tetracycline against multi-drug-resistant *E. coli* [J]. J Biomol Struct Dyn, 2019, 37:1307-1325.
- 40 Qiu F, et al. *In vitro* activity of five flavones from *scutellaria baicalensis* combination with cefazolin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Med Chem Res, 2016, 25:2214-2219.
- 41 Kirmusaoglu S. Sensitizing of β -lactam resistance by tannic acid in methicillin-resistant *S. aureus* [J]. World J Microb Biot, 2019, 35(4):57.
- 42 Miladi H, et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens [J]. Microb Pathogenesis, 2016, 99:95-100.
- 43 Liu C, et al. *Pithecellobium clypearia* extract enriched in gallic acid and luteolin has antibacterial activity against MRSA and reduces resistance to erythromycin, ceftriaxone sodium and levofloxacin [J]. J Appl Microbiol, 2020, 129:848-859.
- 44 Sadiq MB, et al. Antibacterial activities and possible modes of action of *Acacia nilotica* (L.) Del. against multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* [J]. Molecules, 2017, 22(1):47.
- 45 Kim MK, et al. *In vitro* synergism and anti-biofilm activity of quercetin pivaloxymethyl conjugate against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species [J]. Chem Pharm Bull, 2018, 66:1019-1022.
- 46 Deepika MS, et al. Combined effect of a natural flavonoid rutin from citrus sinensis and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation [J]. Food Control, 2018, 90:282-294.

- 47 Dwivedi GR, et al. Antibiotics potentiating potential of catharanthine against superbug *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Biomed Struct Dyn, 2018, 36:4270-4284.
- 48 Abreu AC, et al. Combinatorial approaches with selected phytochemicals to increase antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. Biofouling, 2016, 32:1103-1114.
- 49 Lee S, et al. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with beta-lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. Phytomedicine, 2017, 24:49-55.
- 50 Dey D, et al. Polyphenolic secondary metabolites synergize the activity of commercial antibiotics against clinical isolates of beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Phytother Res, 2016, 30:272-282.
- 51 Allen HK, et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8:251-259.
- 52 Ziani BEC, et al. Phenolic profiling, biological activities and *in silico* studies of *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne ssp. *raddiana* extracts [J]. Food Biosci, 2020, 36:100616.
- 53 Blair JMA, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(1):42-51.
- 54 Cao M. The research on inhibitors screened from natural medicine monomers [D]. Guiyang: Guizhou University (贵州大学), 2016.
- 55 Akilandeswari K, et al. Synergistic antibacterial effect of apigenin with beta-lactam antibiotics and modulation of bacterial resistance by a possible membrane effect against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Cell Mol Biol, 2016, 62(14):74-82.
- 56 Al-Shabib NA, et al. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Food Control, 2017, 79:325-332.
- 57 Abu El-Wafa WM, et al. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Braz J Microbiol, 2020, 51:1079-1092.
- 58 Siriyong T, et al. Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. BMC Complem Altern M, 2017, 17:405.
- 59 Salaheen S, et al. Eradication and sensitization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to methicillin with bioactive extracts of berry pomace [J]. Front Microbiol, 2017, 8:253.