

編號：CCMP92-RD-006

利用活體外及活體內試驗分析黃芩 對鏈球菌的抗菌活性

莊銀清

財團法人奇美醫院醫學研究部

摘要

收集 39 株 vancomycin-resistant enterococcus (VRE) 的臨床菌株，藉由 agar dilution 的方法去偵測 baicalein 和 gentamicin 的 MICs。baicalein 和 gentamicin 的 MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 皆 > 256 µg/ml。利用 checkerboard 的方法將 baicalein 和 gentamicin 相加使用，根據 fractional inhibitory concentration indices 的判斷，分別對 VRE-70、VRE-940、VRE-096 和 VRE-721 具有協同作用。更進一步進行 time-kill studies 隨機選擇一株臨床菌株 VRE-096，將 VRE-096 的菌量調至約 5×10^5 與 baicalein 32 µg/ml ($1/8 \times \text{MIC}$) 和 gentamicin 128 µg/ml ($1/2 \times \text{MIC}$) 一起培養，VRE 可被抑制持續到 48 小時。Baicalein 和 gentamicin 合併使用時菌數大約比起始菌數少 2 個 logs，而比單獨的 baicalein 大約少 3 個 logs，這個實驗被持續觀察 48 小時。我們下一個結論，在體外試驗 baicalein 和 gentamicin 對抑制 VRE 具有協同作用。

關鍵詞：抗生素 (antibiotics)、黃芩 (Huangqin)、黃芩元 (baicalein)、
Vancomycin-resistant enterococcus

Number : CCMP92-RD-006

In vitro and in vivo antimicrobial activities of baicalein against streptococci

Chuang, Yin-Ching

Chi Mei Medical Center

ABSTRACT

MICs of baicalein as well as gentamicin against 39 clinical isolates of vancomycin-resistant enterococcus (VRE) were determined by the agar dilution method. MIC_{50s} and MIC_{90s} of baicalein and gentamicin were all > 256 µg/ml. Synergistic effect between baicalein and gentamicin were demonstrated on four clinical isolates of VRE (VRE-70, VRE-940, VRE-096 and VRE-721) by checkerboard methods based on the fractional inhibitory concentration indices. Further time-kill studies were conducted with these two agents against one randomly chosen clinical isolate VRE-096. When approximately 5×10^5 CFU/ml of VRE-096 was incubated with both baicalein at a concentration of 32 µg/ml ($1/8 \times$ MIC) and gentamicin at a concentration of 128 µg/ml ($1/2 \times$ MIC), there was an inhibitory effect against VRE that persisted for 48 h. The combination of baicalein and gentamicin at these respective concentrations showed a reduction of growth by approximately 2 orders of magnitude compared to that for the starting inoculum and by 3 orders of magnitude compared to that with baicalein, the more active single agent, was used alone was observed at 48 h. We concluded that baicalein and gentamicin acted synergistically in inhibiting VRE in vitro.

Keywords: antibiotics, Huangqin, Vancomycin-resistant enterococcus, baicalein

壹、前言

近幾年由於抗生素的大量使用，許多菌也漸漸開始產生了抗藥性，所以一直希望開發除了抗生素以外的治療藥物，中藥是我們老祖宗所留下的寶貝但中藥始終一直蒙上一層神秘面紗，但近幾年國人也開始轉移研究的方向對中藥產生興趣。此研究題目主要是針對黃芩的複合物做治療感染菌的研究，從本草綱目中發現黃芩具有鎮熱、解痛的療效，所以將黃芩拿來偵測 vancomycin-resistant enterococcus 看是否能以中藥來取代抗生素在臨床上的治療。

貳、材料與方法

偵測 39 株 VRE 對 baicalein 和 gentamicin 的最小抑菌濃度，利用 agar dilution 的方法來偵測以下抗生素的 MICs：vancomycin, baicalein, gentamicin。

Vancomycin 和 gentamicin 二種抗生素是溶於無菌水，Baicalein 是溶在 1% 的 ammonia 溶液。隨著以下的濃度藥物與培養基混合在一起：vancomycin 1-128 $\mu\text{g/ml}$ ；baicalein 1-256 $\mu\text{g/ml}$ ；gentamicin 2-256 $\mu\text{g/ml}$ 。菌株的前製備和前面所提的一樣，並將菌液點在事先已準備好的含抗生素的培養基上，每點菌量大約在 1×10^4 CFU/ml 再將培養盤放至 37°C 培養箱中，培養 24 小時，觀察細菌在最低濃度時被完全抑制的濃度，此為此菌的最小抑制濃度。以 E.coli ATCC 25922 做為控制組。

Checkerboard determination

隨機選擇四株臨床菌株 VRE-70，VRE-940，VRE-096 和 VRE-721 來偵測 checkerboard 微量分析，其濃度為 baicalein MIC 的 1/32 - 2 倍，和 gentamicin MIC 的 1/128 - 8 倍在 96 well 的培養盤中被稀釋，將準備大約 1×10^6 CFU/ml 的菌液加入到每個 well 中，將培養盤放至 37°C 的培養箱中培養 18 小時針對抗生素之間的相互作用，根據 fractional inhibitory concentration (FIC) 做為判斷依據，其計算公式為： $\text{FIC}_A = (\text{MIC}_A \text{ in combination}) / (\text{MIC}_A \text{ alone})$ ， $\text{FIC}_B = (\text{MIC}_B \text{ in combination}) / (\text{MIC}_B \text{ alone})$ ，and the FIC index = $\text{FIC}_A + \text{FIC}_B$ ，where FIC_A (FIC_B) and MIC_A (MIC_B) are the FIC and MIC for antibiotic A (B)，FIC 值最後表示抗生素之間的相互作用為：協同作用， $\text{FIC index} \leq 0.5$ ；加成作用， $0.5 < \text{FIC index}$

<1 ；無差異， $1 < \text{FIC index} \leq 4$ ；抗藥作用， $\text{FIC index} > 4$ 。

活體實驗：

小鼠對 VRE-096 之致死劑量：

BALB/c 購置國家實驗動物中心，雌性約 10 至 14 週齡，實驗期間給於與正常之飲水及飼料。實驗時將 BALB/c 以每五隻一組，給予不同濃度之 VRE 096 細菌（劑量由 1×10^5 至 5×10^9 CFU/mouse），觀察小鼠的存活率（見圖三）。

黃芩 元合併 Gentamicin 對小鼠感染 VRE-096 治療之評估：

將 BALB/c 小鼠每五隻一組，以腹腔注射給予 3.0×10^9 CFU 的 VRE-096，一小時後給予黃芩 元合併 Gentamicin 或單獨使用，並觀察小鼠存活率。

黃芩 元以百分之四的酒精溶解，每二十四小時給予一次，Gentamicin 則溶於生理食鹽水中（每毫升含 1 毫克），每十二小時一劑，連續三天（見圖四）。

灌食方式給予黃芩 元治療 VRE 感染之 BALB/c 小鼠：

將 BALB/c 小鼠每八隻一組，由腹腔注射致死劑量之 VRE-096 [3.5×10^9 CFU/ml]，一小時後再以灌食給予不同劑量之黃芩 元 [2 mg/mouse、0.5 mg/mouse、0.2 mg/mouse]，二十四小時後再給一劑，並觀察小鼠死亡率（見圖五）。

灌食黃芩 元合併腹腔給予 Gentamicin 治療 VRE 感染 BALB/c 小鼠：

將 BALB/c 小鼠每八隻一組，由腹腔注射致死劑量之 VRE-096 [5×10^9 CFU/ml]，一小時後給予黃芩 元合併 Gentamicin 或單獨使用，並觀察小鼠存活率。黃芩 元以生理食鹽水溶解（每毫升含 5 毫克），每隻小鼠給予 100 微升，每二十四小時給予一次，Gentamicin 溶於生理食鹽水中（每毫升含 1 毫克），每隻小鼠給予 100 微升，每十二小時一劑，連續三天（圖六）。

VRE-096 灌食 BALB/c 小鼠：

將 BALB/c 小鼠每五隻一組，在飲用水中添加 Vancomycin 25 mg/100ml 以清除腸道內正常菌群，並每日更換飲水至實驗結束。給予 Vancomycin 後以口服給予 VRE-096 (1×10^{10} /mouse)，並從小鼠糞便中偵測 VRE。VRE 之偵測方式：以棉花棒沾取肛門後，將試紙塗抹於 Campyl BAP 上，於挑取菌落培養於 Enterococcosel agar 上， 37°C 隔夜培養後，挑取黑色菌落，以觸酶（catalase）試驗，catalase 陰性菌落，培養於 6.5% NaCl broth 中，若能生長可判定為 VRE。

灌食黃芩 元合併腹腔給予 Gentamicin 以清除 BALB/c 小鼠腸道中之 VRE：

將 BALB/c 小鼠每五隻一組，在飲用水中添加 Vancomycin 25 mg/100ml，並每日更換飲水至實驗結束。以口服給予 VRE-096 (1×10^{10} /mouse)，次日給予含黃芩 元 13.3 mg/100 ml 及/或 Gentamicin 30 mg/100 ml 之飲用水至實驗結束。

參、結果

MICs

在體外試驗，測試 39 株 VRE 的臨床菌株，結果將呈現在表一。Gentamicin、baicalein 和 vancomycin 的 MIC₉₀ 皆大於 256 μ g/ml。針對 VRE-096 其 gentamicin、baicalein 的 MICs 皆大於 256 μ g/ml、vancomycin 的 MIC 256 μ g/ml。

Checkerboard determinations

VRE-70, VRE-940, VRE-096 和 VRE-721 的 FIC index 分別為 0.189, 0.039, 0.314 和 0.157 此四株的 baicalein 和 gentamicin 的 MICs 呈現在表二。baicalein 在濃度 2-16 μ g/ml 和 Gentamicin 混合時，會降低他們的 MIC 值。

Determinations of inhibitory effects of baicalein and gentamicin alone, and in combination against VRE in time-kill kinetics.

當 VRE-096 菌量大約在 5×10^5 CFU/ml 和 baicalein 16 μ g/ml 一起培養時，沒有抑制效果，然而當 baicalein 在 32 μ g/ml 和菌液培養可抑制至 12 小時，當 VRE 被抗生素抑制後再生長時，與控制組達相等菌量是在 48 小時；當 baicalein 64 μ g/ml 時可抑制 VRE 持續 36 小時，呈現在圖一。

Baicalein 32 μ g/ml ($1/8 \times$ MIC) 和 gentamicin 128 μ g/ml ($1/2 \times$ MIC) 混合使用並與 VRE-096 一起培養時可抑制持續至少 48 小時，這個時間點的菌數大約比起始菌數少 2 個 logs，而較單獨的 baicalein 大約少 3 個 logs，其數據呈現在圖二。

活體實驗：

在本研究計畫中動物實驗部分，首先我們先進行 VRE-096 對 BALB/c 小鼠的致死劑量研究，實驗結果發現，小鼠的對 VRE-096 的致死劑量約介於 5×10^8

至 5×10^9 CFU/mouse 之間 (圖三)。毒性較為低。故再後續實驗中我們多選擇 3×10^9 至 5×10^9 CFU/mouse 之間的劑量來作腹腔注射。在 VRE-096 腹腔感染小鼠實驗中，我們發現以腹腔注射給予低劑量的 baicalein (0.016 mg/mouse)，不論是否合併 Gentamicin 似乎都無明顯的療效 (圖四)。

而在以 baicalein 灌食治療 VRE 感染實驗中，我們則發現當小鼠給予 0.5 毫升 baicalein 較給予高劑量 (每隻小鼠給予 2 毫克) 及低劑量 (每隻小鼠給予 0.2 毫克) 有較高的存活率 (71.43% 比 42.86%) (見圖五)。故後續以 0.5 毫克劑量的 baicalein 合併 Gentamicin 使用，結果顯示合併使用 baicalein 與 Gentamicin，並不能增加小鼠的存活率 (圖六)。

另外，我們嘗試以口服 VRE-096 建立一個小鼠感染的腸道模式，實驗中，我們在小鼠的飲水添加 Vancomycin (25 mg/100 ml)，可以使小鼠腸道感染 VRE 的時間由未添加 Vancomycin 的十天之內增加至三十天左右 (表三)。而以 baicalein 合併 Gentamicin 或單獨使用 baicalein、Gentamicin，並無法清除小鼠腸道之 VRE (表四)。

肆、討論

在臨床上已經有許多感染菌對抗生素產生了抗藥性使得療效下降，且抗生素的發展緩慢而無法跟上感染菌產生抗藥性的速度，所以我們將轉移對傳統中藥的研究，探討中藥對感染菌的治療效果。在本研究中發現 baicalein 和 gentamicin 混合使用時可有效的對 vancomycin-resistant enterococcus 產生抑制生長的效果，但在臨床的治療上仍尚待評估。

在動物實驗中，我們嘗試以不同的實驗模式來證實 baicalein 在 In vitro 實驗中表現出的極佳效果，但是皆未能有明顯的成效出現，這是較令人感到遺憾的，或許必須以其它我們未設想到的實驗方法，方能見到 baicalein 對 VRE 的活體中療效！

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP92-RD-006 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. Akao, T., K. Kawabata, E. Yanagisawa, K. Ishihara, Y. Mizuhara, Y. Wakui, Y. Sakashita, and K. Lobashi. Baicalin, the predominant flavone glucuronide of *scutellariae radix*, is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000; 52: 1563-1568.
2. Chuang, Y. C., J. W. Liu, W. C. Ko, K. Y. Lin, J. J. Wu, and K. Y. Huang. In vitro synergism between cefotaxime and minocycline against *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 2214-2217.
3. Chuang, Y. C., W. C. Ko, S. T. Wang, J. W. Liu, C. F. Kuo, J. J. Wu, and K. Y. Huang. Minocycline and cefotaxime in the treatment of experimental murine *Vibrio vulnificus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42: 1319-1322.
4. Edmond, M. B., S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones, and R. P. Wenzel. Nosocomial bloodstream infection in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 29: 239-244.
5. Eliopoulos, G. M., B. F. Farber, B. E. Murray, C. Wennersten, and R. C. Moellering Jr. Ribosomal resistance in clinical enterococcal isolates to streptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984; 25: 398-399.
6. Facklam, R. R., D. F. Sahm, and L. M. Teixeira. 1999. Enterococcus, p. 297-305. In: Murray P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. T. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington. DC.
7. Huang, H.-C., H.-R. Wang, L.-M. Hsieh. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 251:91-93.
8. Kimura, Y., M. Kubo, T. Tani, S. Arichi, and H. Okuda. Studies on *Scutellariae Radix* IV: effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 1981; 29: 2610-2617.
9. Koda, A., H. Nagai, and H. Wada. Pharmacological actions of baicalin and baicalein II: effects on active anaphylaxis. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1970; 66: 237-247.
10. Kubo, M., H. Matsuda, M. Tanaka, Y. Kimura, H. Okuda, M. Higashino, T. Tani, K. Namba, and S. Arichi. Anti-arthritic and anti-inflammatory actions of

- methanolic extract and flavonoid components from *Scutellariae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* 1984; 32: 2724-2729.
11. Leclercq, R., S. Dutka-Malen, A. Brisson-Noel, C. Molinas, E. Derlot, M. Arthur, J. Duval, and P. Courvalin. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 15: 495-510.
 12. Liu, I. X., D. G. Durham, and M.E. Richards. Baicalin synergy with β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other β -lactam-resistant strains of *S. aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000; 52: 361-366.
 13. Moellering, R. C. Jr. 2000. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis*, and *Leuconostoc* species, p. 2147-2156. In: Mandell, G. L., J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa.
 14. Moellering, R. C. Jr., and A. N. Weiberg. Studies on antibiotic synergism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of ^{14}C -labelled streptomycin by enterococci. *J. Clin. Invest.* 1971; 50: 2580-2584.
 15. Moody, J. A., D. N. Gerding, and L. R. Peterson. Evaluation of ciprofloxacin's synergism with other agents by multiple in vitro methods. *Am. J. Med.* 1987; 82 (suppl 4A): 44-54.
 16. Murray, B. E. The life and times of enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3: 46-65.
 17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-Fourth Edition; Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standards-Seventh Edition. M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 19. Norden, C. W., H. Wentzel, and E. Keleti. Comparison of techniques for measurement of in vitro antibiotic synergy. *J. Infect. Dis.* 1979; 140: 629-633.
 20. Stevens, D. L., K. J. Madaras-kelly, and D. M. Richards. In vitro antimicrobial effects of various combinations of penicillin and clindamycin against four strains

- of *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42: 1266-1268.
21. Tsao, T. F., M. G. Newman, Y. - Y. Kwok, and A. K. Horikoshi. Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *J. Dent. Res.* 1982; 61: 1103-1106.
 22. Wakabayashi, I. Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages. *Pharmacol. Toxicol.* 1999; 84: 288-291.
 23. Wang, Y. S. *Pharmacology and applications of Chinese herbes*, 1983; p. 1022-1027. People's Health Publishing House, Beijing.
 24. White, R. L., D. S. Burgess, M. Manduru, and J. A. Bosso. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 1914-1918.

[..\23\5-08 圖\)--CCMP92-RD-006.doc](#)