

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20201105001

徐怡婷, 孙昊宇, 林志芬, 等. 中药抗菌剂对费氏弧菌的单一及联合毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(5): 239-248

Xu Y T, Sun H Y, Lin Z F, et al. Single and combined toxicities of traditional Chinese medicine antibacterials on *Aliivibrio fischeri* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(5): 239-248 (in Chinese)

中药抗菌剂对费氏弧菌的单一及联合毒性效应

徐怡婷¹, 孙昊宇², 林志芬², 印春生^{1,*}

1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306

2. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092

收稿日期: 2020-11-05 录用日期: 2021-01-25

摘要: 抗生素滥用所导致的环境问题日益受到人们的关注, 寻找传统抗生素的可能替代品迫在眉睫。从中药中提取的具有抗菌活性的化合物(简称中药抗菌剂)因具有资源丰富、抗菌谱广和不良反应低等特点, 有望成为未来替代抗生素的关键。因此, 有必要探究中药抗菌剂的毒性效应, 这可以对未来中药抗菌剂使用后的生态风险提供指导。本文以费氏弧菌作为模式生物, 分别测定了大黄素(emodin, EMO)、大黄酸(rhein, RH)、芦荟大黄素(aloe-emodin, AE)和双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA) 4种中药抗菌剂对费氏弧菌的单一和多元联合毒性, 同时进行了抑菌作用机理的初步讨论。结果表明, 4种中药抗菌剂对费氏弧菌的生物荧光均能产生较为明显的抑制作用, 毒性排序是 EMO>RH>AE>DHA。而当 EMO、RH、AE 和 DHA 混合暴露时, 混合物在高浓度区间的联合毒性作用模式均为拮抗, 推测是受试中药抗菌剂之间互相竞争性地对 NADH 脱氢酶产生抑制作用, 从而导致对发光反应的抑制作用较单一暴露时减弱。本研究对未来中药抗菌剂单一及联合毒性效应的研究具有积极的推动作用, 有望为今后中药抗菌剂的生态风险评价提供参考。

关键词: 中药抗菌剂; 费氏弧菌; 单一毒性; 联合毒性; 生物荧光; 拮抗效应

文章编号: 1673-5897(2021)5-239-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Single and Combined Toxicities of Traditional Chinese Medicine Antibacterials on *Aliivibrio fischeri*

Xu Yiting¹, Sun Haoyu², Lin Zhifen², Yin Chunsheng^{1,*}

1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China

Received 5 November 2020 accepted 25 January 2021

Abstract: More and more attention has been paid to the environmental problems caused by the overuse of antibiotics, and it is urgent to seek possible alternatives to traditional antibiotics. Due to the rich resources, wide antibacterial spectrum, and low adverse reactions, traditional Chinese medicine antibacterials (TCM antibacterials for short) are deemed to be the possible substitutes for antibiotics in the future. Therefore, it is necessary to explore the toxic

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22006116, 21777123); 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室自主研究(重点)项目(PCRRK16007); 博士后创新人才支持计划(BX20190247); 中国博士后科学基金资助项目(2019M661624); 上海“超级博士后”激励计划(2019194)

第一作者: 徐怡婷(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物毒理学, E-mail: yitingxu@aliyun.com

*** 通讯作者 (Corresponding author),** E-mail: csyin@shou.edu.cn

effects of TCM antibacterials, which could provide a guidance for the ecological risks after the use of TCM antimicrobials. In this study, the single and joint toxicities of four TCM antibacterials (including emodin (EMO), rhein (RH), aloe-emodin (AE), and dihydroartemisinin (DHA)) on *Aliivibrio fischeri* were tested, and the antibacterial mechanism was preliminarily explored. The results showed that the four TCM antibacterials exhibited significant inhibition on the bioluminescence of *Aliivibrio fischeri*, and the order of toxicity was $\text{EMO} > \text{RH} > \text{AE} > \text{DHA}$. When EMO, RH, AE, and DHA were mixed, the joint toxicities of the mixtures in the high concentration range were antagonism. It was speculated that the TCM antibacterials competitively inhibited NADH dehydrogenase, leading to a weaker inhibitory effect of the mixtures on the luminescence reaction than that of single agent. This study will promote the study of single and joint toxicities of TCM antibacterials in the future, and provide a reference for the ecological risk assessment of TCM antibacterials.

Keywords: TCM antibacterials; *Aliivibrio fischeri*; single toxicity; joint toxicity; bioluminescence; antagonism

近年来,随着抗生素的广泛以及不合理使用,环境中产生了大量的耐药菌。目前,临床中耐药菌的检出率有逐年增加的趋势,更有研究报道了超级耐药细菌的出现^[1],这可能导致抗生素在治疗感染性疾病时的药效降低甚至完全失效,对人类的健康构成了极大威胁。因此,研究人员试图寻求新的抗菌药物来替代传统的抗生素类药物,以缓解目前抗生素大量使用导致的细菌耐药性问题。

中药作为我国传统医学的重要组成部分,在治疗感染性疾病方面有着悠久的历史,具有资源丰富、价格低廉、成分复杂、作用靶点多、抗菌谱广、安全性高和毒副作用小的特点。例如, Peng 等^[2]发现小檗碱对无乳链球菌具有抑制作用,且最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为 $78 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,初步的机制研究发现小檗碱可能通过破坏细菌的细胞膜结构和抑制蛋白质与 DNA 的合成,最终导致无乳链球菌死亡。Chinnam 等^[3]研究发现黄芩素对大肠杆菌具有较强的抑菌作用,其抑制作用的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})约为 $0.29 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外,有研究表明细菌对中药不易产生耐药性^[4-5]。因此,以中药为母体,从中药材中提取有效的、环境友好的抗菌药物,将可能是一种缓解目前细菌耐药性污染的新途径。

目前,从中药中提取的具有抗菌活性的成分可以被称为中药抗菌剂,主要有蒽醌类、萘类、生物碱类、黄酮类、有机酸类、挥发油类、糖类和皂苷类物质^[6]。其中,蒽醌类和萘类化合物在自然界分布广泛,是许多中草药的重要组成部分。此外,蒽醌类化合物因其分子内含有蒽醌结构,能够抑制细菌的呼吸代谢、破坏细菌的细胞壁和细胞膜、抑制蛋白合成及作用于遗传物质、干预细菌生物膜形成过程、抗内

毒素,从而对多种细菌表现出抑制作用^[7]。大黄素(emodin, EMO)是一种存在于大黄、何首乌、决明子和虎杖等多种中药材中的羟基蒽醌类衍生物。目前,已有研究发现 EMO 具有广谱抑菌作用,对白喉、枯草、副伤寒、流感杆菌及肺炎球菌和卡他球菌有效,且对厌氧菌有很强的抑制作用,同时金黄色葡萄球菌对其不易产生耐药性,链球菌亦对其敏感^[8]。大黄酸(rhein, RH)是大黄的主要有效成分之一,亦为蒽醌类衍生物,其药理作用广泛。近年来,有诸多研究表明 RH 具有很好的抑菌效果。例如, Azelmat 等^[9]研究发现 RH 对牙龈卟啉单胞菌具有较强的抑制作用,其 MIC 为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。芦荟大黄素(aloe-emodin, AE)是从芦荟、大黄及决明子等传统中药中提取的一种蒽醌类生物活性成分,对大肠埃希菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、幽门螺旋杆菌及结核分枝杆菌等表现出明显的抗菌活性^[10]。双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是青蒿素经硼氢化钠还原得到的衍生物,属于萜类化合物,其抗菌效应的报道多集中于对抗生素的增强作用上。例如, Li 等^[11]发现 DHA 与 β -内酰胺类抗生素联用时,可以通过作用于大肠杆菌的药物外排泵 AcrB 而增加 β -内酰胺类抗生素在细菌体内的蓄积,达到协同抗菌作用。

抗菌剂往往被联合使用以起到提高抗菌效果的目的。例如,任皓等^[12]测定了盐酸金霉素、吉他霉素、盐霉素和黄霉素对明亮发光杆菌的联合毒性,发现吉他霉素与盐酸金霉素、盐霉素和黄霉素的二元组合对细菌的联合毒性表现出较强的协同作用。Wang 等^[13]发现磺胺、磺胺增效剂和四环素的三元混合物对费氏弧菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌这 3 种细菌都呈现出协同效应。那么,中药抗菌剂的联

合毒性效应如何? 其联合毒性作用又会呈现出怎样的形式呢? 这个问题对未来中药抗菌剂应用后的生态风险研究具有重要意义,但目前还鲜有报道。

本文以费氏弧菌(*Aliivibrio fischeri*, *A. fischeri*)作为模式生物,由于费氏弧菌发光敏感的特点,以其生物荧光作为测试终点,以研究已证明具有抑菌性能的 EMO、RH、AE 和 DHA 作为中药抗菌剂的代表,通过快速、有效和简便的急性毒性试验^[14]测定了它们对 *A. fischeri* 生物荧光的单一和多元联合毒性效应,同时进行了抑菌作用机理的初步讨论,不仅有利于更全面和深入地认识中药抗菌剂联合暴露对细菌的影响,为今后中药抗菌剂使用后的生态风险评估提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂和生物

实验所用 EMO、RH 和 AE 均购自上海麦克林生化科技有限公司(上海,中国),DHA 购自上海源叶生物科技有限公司(上海,中国),具体信息如表 1 所示。进行毒性测试所用化合物配制使用助溶剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),DMSO 为分析纯,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(上海,中国),体系中 DMSO 的终浓度控制在总体积的 0.5%(V/V)以下,以减少 DMSO 对细菌的影响。EMO、RH、AE 和 DHA 这 4 种化合物因为溶解度有

限,配制的最大母液浓度分别是 1.92×10^{-5} 、 1.23×10^{-5} 、 9.55×10^{-5} 和 $2.23 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本实验模式生物费氏弧菌 *A. fischeri*(ATCC 7744)冻干干粉购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, 马纳萨斯,维吉尼亚州,美国)。

1.2 菌液配制

在无菌操作台中,从第 3 代菌株斜面上取一接种环大小的菌种接入 5 mL 的液体培养基中,在 22 ℃ 恒温振荡培养箱中培养 12 ~ 14 h 至对数生长期成为摇瓶菌液。取对数生长期摇瓶菌液加入到 2% NaCl 溶液中,磁力搅拌 40 min,调整细菌生物荧光的光值(相对光度单位, relative light units, RLU)至 75 000 ~ 80 000,即可将制成的工作菌液用于毒性测定。

1.3 毒性试验

受试中药提取抑菌剂对 *A. fischeri* 的毒性实验在 Luminoskan Ascent 发光分析仪(赛默飞世尔科技有限公司,美国)上使用非透明 96 孔板以生物荧光作为测试终点进行,具体步骤如下:取受试化合物用适量 DMSO 配制成浓度较高的标准溶液,再用 2% NaCl 稀释成等对数浓度梯度系列。将化合物溶液加入 96 孔板中,每孔包含 160 μL 的受试化合物(作为实验组)或 2% 的 NaCl 溶液(作为对照组)和 40 μL 准备好的菌液。振荡均匀静置 15 min 后测定孔的 RLU 值。每个浓度点至少 3 个平行样。然后,以化合物浓度的对数为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制剂

表 1 实验药品信息
Table 1 Experimental drug information

序号 No.	CAS	名称及简称 Name and abbreviation	结构式 Structural formula	相对分子质量/($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) Relative molecular mass/($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	纯度 Purity
1	518-82-1	大黄素(EMO) Emodin (EMO)		270.24	$\geq 90\%$
2	478-43-3	大黄酸(RH) Rhein (RH)		284.22	98%
3	481-72-1	芦荟大黄素(AE) Aloe-emodin (AE)		270.24	95%
4	71939-50-9	双氢青蒿素(DHA) Dihydroartemisinin (DHA)		284.352	$\geq 98\%$

量-效应曲线(concentration-response curve, CRC)。由于 DHA 在实验最大溶解度条件下,抑制率达不到 50%,故根据单一化合物的抑制率达到 40% 时对应的化合物浓度(EC_{40}),分别配制等毒性比的二元、三元、四元混合溶液^[15],然后按照单一毒性测定方法测定系列混合溶液的联合毒性,再绘制相应的 CRC。化合物毒性用其对 *A. fischeri* 生物荧光的抑制率表述^[16],如式(1)所示:

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{x_0 - x}{x_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: x_0 代表对照组的 RLU 值, x 代表实验组的 RLU 值。

1.4 独立作用(IA)模型判别联合毒性作用

加和作用(concentration action, CA)和独立作用(independent action, IA)模型近年来经常用于混合污染物的联合毒性评价。然而,由于 CA 模型预测时可能存在某些预测盲区^[17],即需要保证混合物中的各个组分单独存在时效应浓度能够对应,因此考虑到某些药物在低浓度时可能存在 Hormesis 效应,中药抗菌剂混合物的联合毒性作用使用 IA 模型进行判别。IA 是一种基于混合物组分具有不同作用模

式的假设而被广泛用来评价联合毒性的参考模型^[18]。其计算公式为:

$$E(c_{\text{mix}}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i)) \quad (2)$$

式中: c_{mix} 和 $E(c_{\text{mix}})$ 代表混合物的总浓度和总效应; $E(c_i)$ 代表组分 i 在混合物中对应 c_i 浓度时的单一效应。IA 曲线的统计学不确定性以 95% 置信区间表示。混合物的联合毒性作用通过比较实际的 CRC 和 IA 曲线进行判别^[9]:(1)实际的 CRC 在 IA 曲线(包含 95% 置信区间)的下方,此时混合物联合毒性呈现拮抗作用;(2)实际的 CRC 位于 IA 曲线(包含 95% 置信区间)的中间,此时混合物联合毒性呈现相加作用;(3)实际的 CRC 在 IA 曲线(包含 95% 置信区间)的上方,此时混合物联合毒性呈现协同作用。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 中药抗菌剂对 *A. fischeri* 的单一毒性

EMO、RH、AE 和 DHA 对 *A. fischeri* 的单一毒性的结果如图 1 所示。通过拟合剂量-效应曲线获得了 EC_{40} ,来表征各中药抗菌剂对 *A. fischeri* 的毒性。EMO、RH、AE 和 DHA 的 EC_{40} 分别为 6.39×10^{-7} 、 2.37×10^{-6} 、 1.74×10^{-5} 和 $1.25 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。可

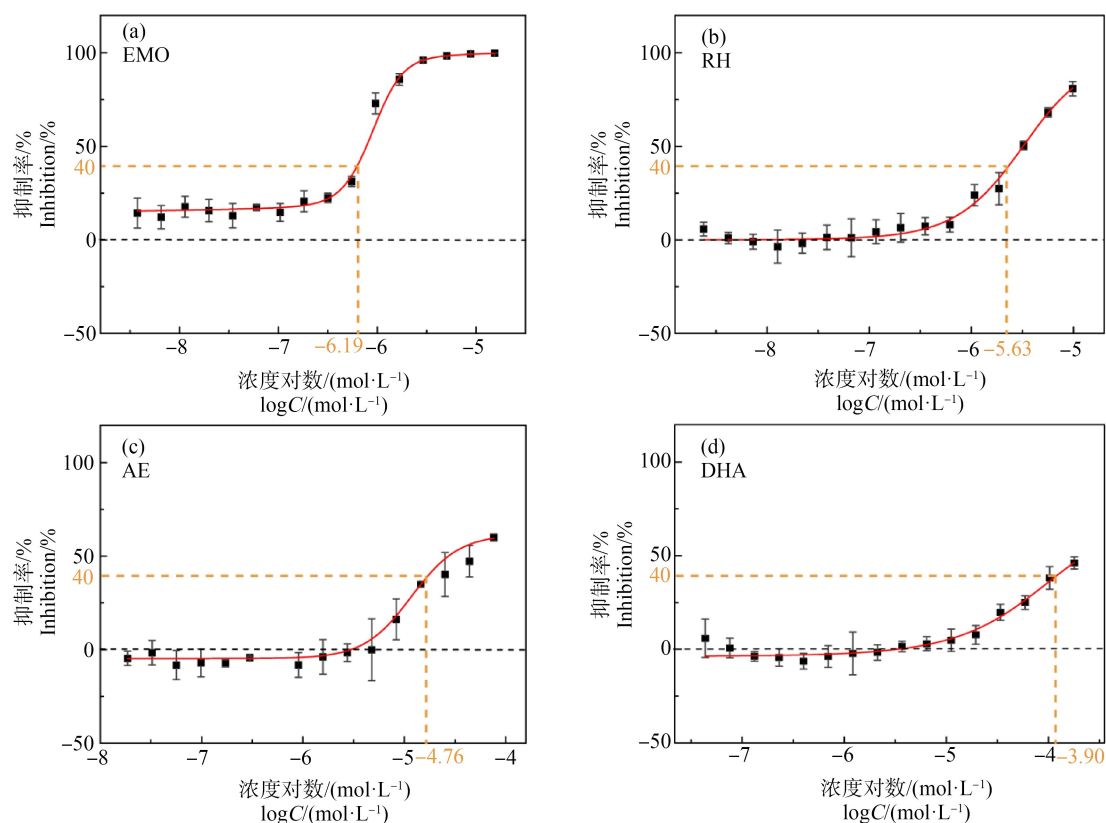
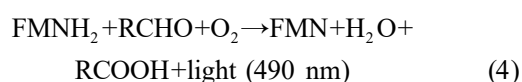


图1 中药提取抑菌剂(TCM)对 *A. fischeri* 的单一毒性

Fig. 1 The single toxicity of traditional Chinese medicine (TCM) antibacterials to *A. fischeri*

以看出,EMO 的 EC_{40} 最小,毒性最大,而 DHA 的 EC_{40} 最大,毒性最小;受试中药提取抑菌剂的毒性顺序为:EMO>RH>AE>DHA。在之前的研究中,Wu 等^[20]发现药用大黄中几种羟基蒽醌化合物的抑菌效果为:RH>EMO>AE。该研究与本文实验结果的差异可能源于模式生物和测试终点的不同:Wu 等^[20]使用的模式生物是金黄色葡萄球菌,测试终点是金黄色葡萄球菌的生长量;而本文以 *A. fischeri* 作为模式生物,测试终点是 *A. fischeri* 的生物荧光发光值。

A. fischeri 的生物荧光来源于以下两步酶促反应^[21-23]:



式中:NADH 表示还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,FMN 表示黄素单核苷酸, NAD^+ 表示氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, $FMNH_2$ 表示还原型黄素单核苷酸,RCHO 表示醛,RCOOH 表示羧酸;反应(3)由 NADH/FMN 氧化还原酶催化,而反应(4)由荧光素酶催化。

已有研究表明,蒽醌化合物 EMO 对 NADH 氧化酶和 NADH 脱氢酶均有较强的抑制作用,且抑制率随药物浓度的增加而增强;而蒽醌化合物 RH、AE 对 NADH 氧化酶的抑制作用不明显,对 NADH 脱氢酶有一定的抑制作用,且 AE 对 NADH 脱氢酶的抑制程度比 RH 弱^[24]。那么,EMO、RH 和 AE 是如何抑制 NADH 氧化酶或 NADH 脱氢酶的活性的呢?从 EMO、RH 和 AE 的结构可以看出这 3 种中药抗菌剂均属于羟基蒽醌类化合物。已有研究表明,羟基蒽醌类药物易与功能蛋白通过氢键形成稳定的复合物,从而阻断功能蛋白的生物学作用^[25-26]。因此,我们推测 EMO 与 NADH 氧化酶以及 NADH 脱氢酶结合形成稳定复合物,RH 和 AE 与 NADH 脱氢酶结合形成稳定复合物,抑制了 NADH 氧化酶或 NADH 脱氢酶的活性,从而阻断线粒体呼吸链电子传递,影响组织细胞生命活动所需能源的供应,最终抑制发光反应表现出毒性作用。有研究发现青蒿素能够通过抑制 NADH 脱氢酶而影响线粒体膜的正常功能^[27],因此推测 DHA 也是通过与 NADH 脱氢酶相互作用来抑制生物荧光。但由于 DHA 不具有羟基蒽醌结构,因此可能无法像 EMO、RH 和 AE 那样通过氢键形成稳定的复合物,从而表现出其对

A. fischeri 的毒性比 EMO、RH 和 AE 小。综上,推测受试中药抗菌剂 EMO、RH、AE 和 DHA 对 *A. fischeri* 生物荧光的抑制作用机制如图 2 所示。

2.2 中药抗菌剂对 *A. fischeri* 的联合毒性

根据单一毒性数据计算拟合出 IA 曲线,同时测定了 EMO、RH、AE 和 DHA 对 *A. fischeri* 生物荧光的多元联合毒性并拟合出相应的 CRC,以判别各混合体系的联合毒性作用。

由图 3 可知,在实验最大溶解度条件下,EMO-RH 的最高抑制率最大,高达 94.55%,RH-AE 次之,最高抑制率为 62.03%,而其余 4 种中药抗菌剂的二元混合物的最高抑制率均未达到 50%,其中 AE-DHA 的最高抑制率最小,为 31.44%。

EMO、RH、AE 和 DHA 的二元混合物的联合毒性作用模式结果如表 2 所示。由图 3 和表 2 可知,EMO-RH、EMO-DHA 均呈现明显的拮抗作用,而 EMO-AE、RH-AE、RH-DHA 以及 AE-DHA 二元混合物实际的 CRC 与 IA 曲线发生了交叉,表现为联合作用模式随混合物浓度发生变化。其中,AE-DHA 展现出了低浓度协同、中浓度相加和高浓度拮抗的联合作用模式,而 EMO-AE、RH-AE 以及 RH-DHA 在低浓度区呈相加作用,在高浓度区呈拮抗作用。

由上可见,在对 *A. fischeri* 的生物荧光产生抑制作用的高浓度区间内,4 种中药抗菌剂的二元混合物的联合毒性作用模式均为拮抗。如图 2 所示,推测可能是在高浓度区,EMO、RH、AE 和 DHA 以等毒性比二元混合时,化合物之间互相竞争性地对 NADH 脱氢酶产生抑制作用,导致对发光反应的抑制作用减弱,最终导致联合毒性降低,表现出拮抗的联合毒性作用模式。

根据图 4 可知,比较 4 种中药抗菌剂的三元混合物的联合毒性效应发现,在实验最大溶解度条件下,EMO-RH-AE 的毒性最强,最高抑制率达 52.17%,EMO-RH-DHA 的毒性较弱,最高抑制率为 22.58%,而 EMO-AE-DHA、RH-AE-DHA 对 *A. fischeri* 无毒性作用。此外,三元混合物实际的 CRC 与 IA 曲线均发生了交叉。其中,除了 RH-AE-DHA 展现出了随混合物浓度升高依次相加、协同、相加、拮抗的联合作用模式,其余三元混合物均在低浓度区呈相加作用,在高浓度区呈拮抗作用。同时,通过观察图 3 和图 4 发现,在 EMO-RH、EMO-AE、RH-AE 二元混合的基础上加入 DHA,对 *A. fischeri* 的联合毒性作用明显减弱。如图 2 所示,推测可能是

EMO、RH、AE 和 DHA 三元混合时,竞争关系更为激烈,对 NADH 脱氢酶的抑制作用大大减弱,最终导致对发光反应的抑制作用急剧减弱,联合毒性大大降低。

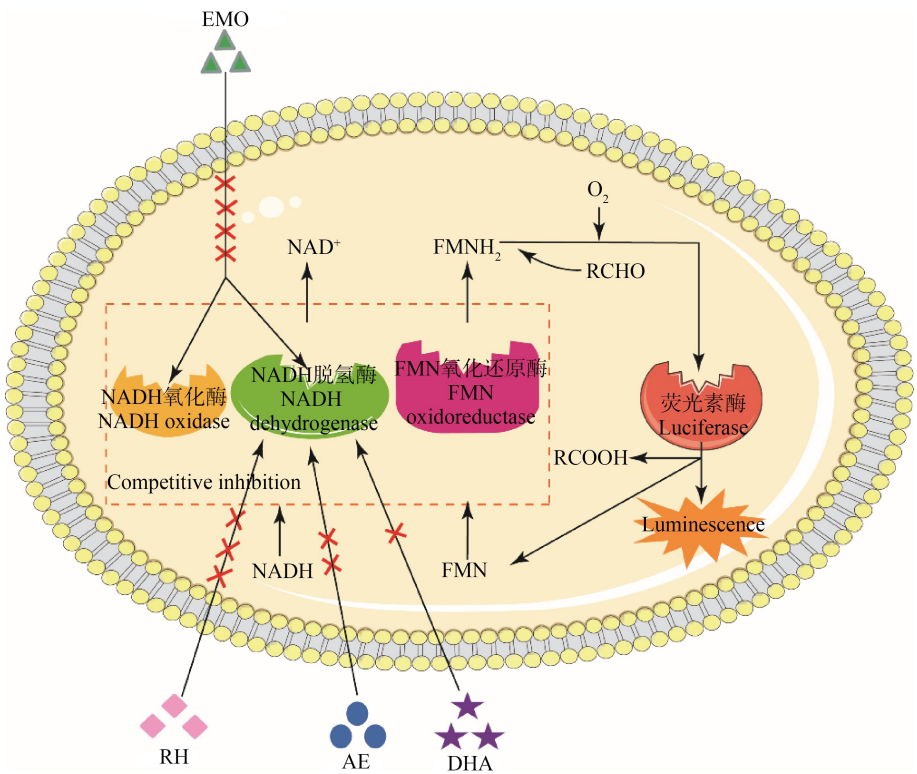


图 2 中药抗菌剂对 *A. fischeri* 的毒性作用机制假设图

注:NADH 表示还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,FMN 表示黄素单核苷酸,NAD⁺表示氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,FMNH₂表示还原型黄素单核苷酸,RCHO 表示醛,RCOOH 表示羧酸;×表示中药抗菌剂对酶的抑制作用,×越多表示抑制作用越大。

Fig. 2 The hypothesis of toxic mechanism of TCM antibacterials on *A. fischeri*

Note: NADH represents reduced nicotinamide adenine dinucleotide; FMN represents flavin mononucleotide; NAD⁺ represents oxidized nicotinamide adenine dinucleotide; FMNH₂ represents reduced flavin mononucleotide; RCHO represents aldehyde; RCOOH represents carboxylic acid; × stands for the inhibition of enzyme by TCM antibacterials and the more “×” means the greater the inhibition.

表 2 等毒性比组成的二元混合物联合毒性

Table 2 Joint toxicity of binary mixture in the equal toxic ratio

混合体系 Mixed system	混合物组成 Composition of mixture	联合毒性作用模式 Joint toxic action
a	EMO-RH	拮抗 Antagonism
b	EMO-AE	相加(低浓度)、拮抗(高浓度) Addition (low concentration), antagonism (high concentration)
c	EMO-DHA	拮抗 Antagonism
d	RH-AE	相加(低浓度)、拮抗(高浓度) Addition (low concentration), antagonism (high concentration)
e	RH-DHA	相加(低浓度)、拮抗(高浓度) Addition (low concentration), antagonism (high concentration)
f	AE-DHA	协同(低浓度)、相加(中浓度)、拮抗(高浓度) Synergistic (low concentration), additive (medium concentration), antagonistic (high concentration)

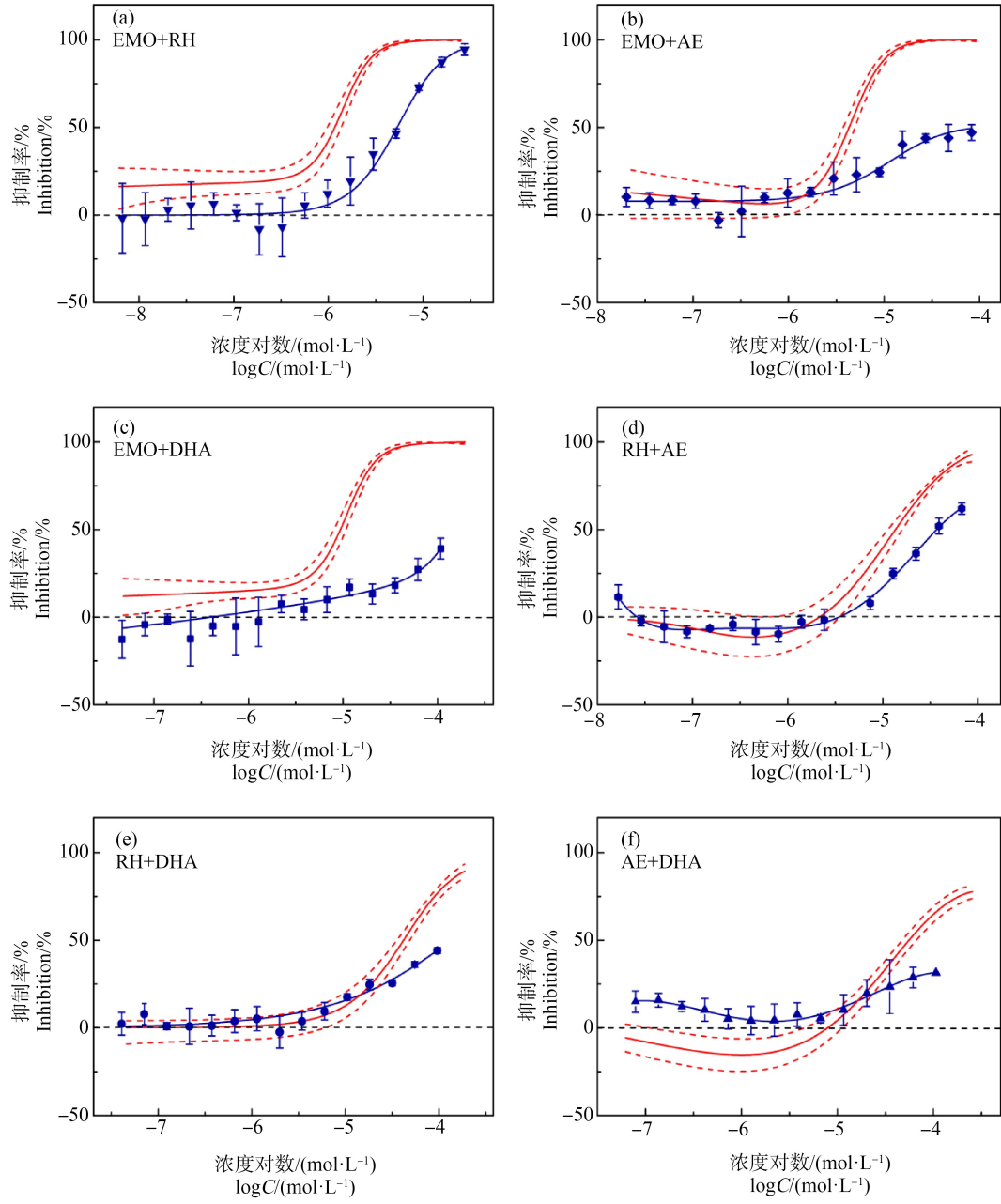


图 3 中药抗菌剂的二元混合物的剂量-效应曲线 (CRCs) 与独立作用 (IA) 曲线 (包含 95% 置信区间)

注: — 表示中药抗菌剂的二元混合物的 CRCs; — 表示中药抗菌剂的二元混合物的 IA 曲线; - - - 表示 IA 曲线的 95% 置信区间。

Fig. 3 The concentration-response curves (CRCs) and the independent action (IA) curves with 95% confidence bands for the binary mixture of TCM antibacterials

Note: — shows the CRCs for the binary mixture of TCM antibacterials; — shows the IA curves for the binary mixture of TCM antibacterials; - - - shows the 95% confidence bands of IA curves.

由图 5 可知,在实验最大溶解度条件下,EMO-RH-AE-DHA 对 *A. fischeri* 几乎无毒性作用。4 种化合物的四元混合物实际的 CRC 与 IA 曲线同样发生了交叉,展现出了在低浓度区呈相加作用,在高浓度区呈拮抗作用。通过观察图 4 和图 5 发现,在 EMO-RH-AE 三元混合的基础上加入 DHA,对

A. fischeri 的联合毒性作用急剧减弱,可能原因是在实验最大溶解度条件下,这 4 种中药抗菌剂联合暴露时,它们会竞争性地对 NADH 脱氢酶产生抑制作用,这种竞争关系很强,最终导致对发光反应几乎不产生抑制作用,联合毒性大大降低。

综上,本文分别测定了 EMO、RH、AE 和 DHA 这

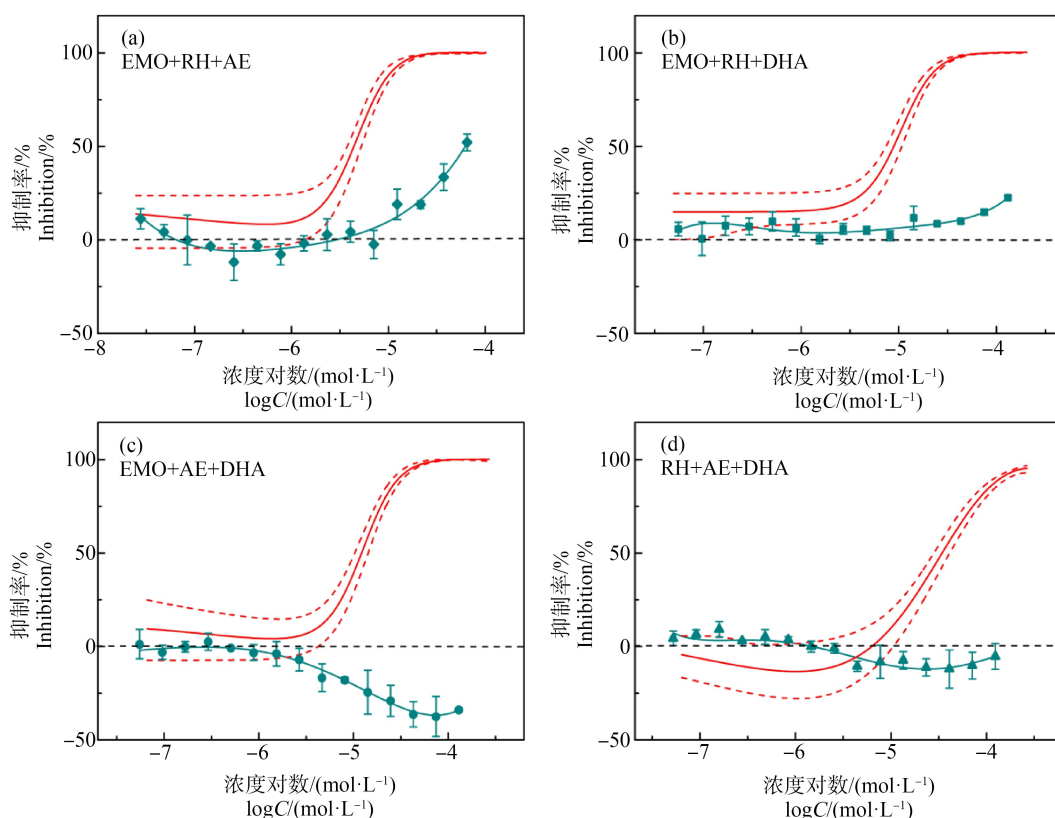


图4 中药抗菌剂的三元混合物的CRCs与IA曲线(包含95%置信区间)

注:——表示中药抗菌剂的三元混合物的CRCs;——表示中药抗菌剂的三元混合物的IA曲线;·····表示IA曲线的95%置信区间。

Fig. 4 The CRCs and the IA curves with 95% confidence bands for the tertiary mixture of TCM antibacterials

Note: —— shows the CRCs for the tertiary mixture of TCM antibacterials; —— shows the IA curves for the tertiary mixture of TCM antibacterials; ····· shows the 95% confidence bands of IA curves.

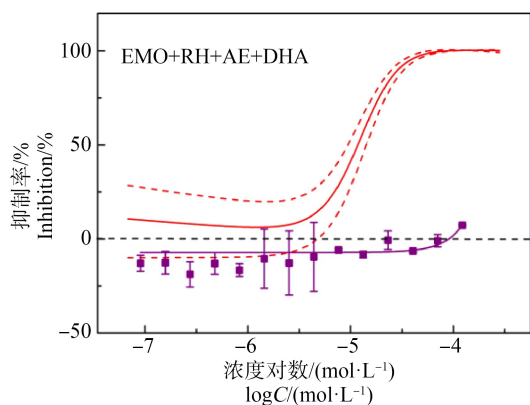


图5 中药抗菌剂的四元混合物的CRCs与IA曲线(包含95%置信区间)

注:——表示中药抗菌剂的四元混合物的CRCs;——表示中药抗菌剂的四元混合物的IA曲线;·····表示IA曲线的95%置信区间。

Fig. 5 The CRCs and the IA curves with 95% confidence bands for the quaternary mixture of TCM antibacterials

Note: —— shows the CRCs for the quaternary mixture of TCM antibacterials; —— shows the IA curves for the quaternary mixture of TCM antibacterials; ····· shows the 95% confidence bands of IA curves.

4种中药抗菌剂对 *A. fischeri* 生物荧光的单一和多元联合毒性,结果表明,EMO、RH、AE和DHA的 EC_{40} 分别为 6.39×10^{-7} 、 2.37×10^{-6} 、 1.74×10^{-5} 和 $1.25 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。受试中药抗菌剂的毒性顺序为:EMO>RH>AE>DHA。DHA的单一毒性比EMO、RH和AE小,推测是由于DHA不具有羟基蒽醌结构,因此可能无法像EMO、RH和AE那样通过氢键与NADH脱氢酶形成稳定的复合物,从而其对 *A. fischeri* 的毒性比EMO、RH和AE小。而测定EMO、RH、AE和DHA的联合毒性时发现,在高浓度区间时,联合毒性作用模式均为拮抗,对 *A. fischeri* 的联合抑制效果反而不如单一作用时强,推测是化合物之间互相竞争性地抑制NADH脱氢酶的活性,导致受试中药抗菌剂对发光反应的抑制作用减弱,联合毒性减弱,联合毒性作用模式均为拮抗。

通过本文的研究,我们发现,这些中药抗菌剂单一作用时对细菌具有较强的毒性作用,但是混合暴露时由于具有相同的靶蛋白,导致其联合毒性减弱,

因此,具有相同靶蛋白的中药抗菌剂联合暴露的生态风险可能低于其单一暴露;在后续研究中,我们考虑将不同结构、作用于不同靶位点或靶蛋白的药物进行研究或将中药抗菌剂和传统抗生素联合进行联合毒性研究。需要指出的是,本文研究的是 EMO、RH、AE 和 DHA 对 *A. fischeri* 的等毒性比联合毒性,但是有时联合毒性的结果与使用的目标化合物的浓度存在很大的关系,不同的浓度配比可能会出现不同的联合毒性结果。因此,在后续研究中建议增加这些化合物对 *A. fischeri* 的非等比联合毒性效应研究。本研究为中药抗菌剂的联合毒性的研究提供了参考,为今后中药抗菌剂使用后的生态风险评估提供了新的依据和新的思路。

通讯作者简介:印春生(1963—),男,博士,教授,主要研究方向为海洋化学。

参考文献 (References):

- [1] Deng Y, Liu J Y, Peters B M, et al. Antimicrobial resistance investigation on *Staphylococcus* strains in a local hospital in Guangzhou, China, 2001—2010 [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2015, 21(1): 102-104
- [2] Peng L C, Kang S, Yin Z Q, et al. Antibacterial activity and mechanism of berberine against *Streptococcus agalactiae* [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(5): 5217-5223
- [3] Chinnam N, Dadi P K, Sabri S A, et al. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 46(5): 478-486
- [4] Ma F, Chen Y, Li J, et al. Screening test for anti-*Helicobacter pylori* activity of traditional Chinese herbal medicines [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 16(44): 5629-5634
- [5] Wu C M, Cao J L, Zheng M H, et al. Effect and mechanism of andrographolide on the recovery of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to several antibiotics [J]. *Journal of International Medical Research*, 2008, 36(1): 178-186
- [6] 黄秀凤. 中药提取物及其化学成分抑菌作用的研究进展[J]. *中国药物与临床*, 2007, 7(5): 370-371
- [7] 邓丽红, 谢臻, 麦蓝尹, 等. 蒽醌类化合物抗菌活性及其机制研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(21): 2450-2455
- [8] 刘静, 王丽. 大黄素的研究进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(35): 3351-3354
- [9] Azelmat J, Larente J F, Grenier D. The anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Archives of Oral Biology*, 2015, 60(2): 342-346
- [10] Smolarz H D, Swatko-Ossor M, Ginalska G, et al. Antimycobacterial effect of extract and its components from *Rheum rhaponticum* [J]. *Journal of AOAC International*, 2013, 96(1): 155-160
- [11] Li B, Yao Q, Pan X C, et al. Artesunate enhances the antibacterial effect of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-TolC [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66(4): 769-777
- [12] 任皓, 王金荣, 陈行杰, 等. 应用发光细菌法检测饲料用抗生素单一及联合毒性的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(21): 49-53
- [13] Wang D L, Wu X D, Lin Z F, et al. A comparative study on the binary and ternary mixture toxicity of antibiotics towards three bacteria based on QSAR investigation [J]. *Environmental Research*, 2018, 162: 127-134
- [14] 阎鹏, 孙礼. 利用发光菌快速检测环境污染物急性毒性的研究概况[J]. *环境与健康杂志*, 2001, 18(4): 250-252
- [15] González Barrios A F, Zuo R J, Hashimoto Y, et al. Auto-inducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022) [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(1): 305-316
- [16] De Zwart D, Slooff W. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants [J]. *Aquatic Toxicology*, 1983, 4(2): 129-138
- [17] 刘树深, 刘玲, 陈浮. 浓度加和模型在化学混合物毒性评估中的应用[J]. *化学学报*, 2013, 71(10): 1335-1340
- [18] Liu SS, Liu L, Chen F. Application of the concentration addition model in the assessment of chemical mixture toxicity [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2013, 71(10): 1335-1340
- [19] Ren H, Wang J R, Chen X J, et al. Primary research on single and combined toxicity of antibiotics in feeds by luminescent bacteria [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2011, 47(21): 49-53 (in Chinese)
- [20] Yan P, Sun L. Survey of study on rapid determination of acute toxicity of environmental pollutants by luminescent bacteria [J]. *Journal of Environment and Health*, 2001, 18(4): 250-252 (in Chinese)

Deng L H, Xie Z, Mai L Y, et al. Advances in studies on antibacterial activity and mechanism of anthraquinone compounds [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2016, 25

- (in Chinese)
- [18] Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 63(1): 43-63
- [19] Thorpe K L, Gross-Sorokin M, Johnson I, et al. An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(Suppl 1): 90-97
- [20] Wu Y W, Gao W Y, Xiao X H, et al. Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in *Rheum officinale* Baill on *Staphylococcus aureus* growth [J]. *Thermochimica Acta*, 2005, 429(2): 167-170
- [21] Hastings J W, Potrikusv C J, Gupta S C, et al. Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1985, 26: 235-291
- [22] Jablonski E, DeLuca M. Studies of the control of luminescence in *Beneckea harveyi*: Properties of the NADH and NADPH: FMN oxidoreductases [J]. *Biochemistry*, 1978, 17(4): 672-678
- [23] Meighen E A. Bacterial bioluminescence: Organization, regulation, and application of the lux genes [J]. *FASEB Journal*, 1993, 7(11): 1016-1022
- [24] 陈春麟, 何冰芳, 陈琼华. 中药大黄的生物化学研究——蒽醌衍生物对线粒体 NADH 氧化酶和琥珀酸氧化酶的抑制作用[J]. *生物化学杂志*, 1988, 4(1): 36-41
- Chen C L, He B F, Chen Q H. Biochemical study of Chinese rhubarb inhibition of anthraquinone derivatives on NADH oxidase and succinate oxidase of mitochondrion [J]. *Chinese Biochemical Journal*, 1988, 4(1): 36-41 (in Chinese)
- [25] 韩冬, 宋志英, 付正卿, 等. 三种羟基蒽醌类药物与溶菌酶的作用及其构效关系研究[J]. *化学研究与应用*, 2014, 26(5): 679-684
- Han D, Song Z Y, Fu Z Q, et al. Study on interaction and structure-activity relationship between three kinds of hydroxyanthraquinone drugs and lysozyme [J]. *Chemical Research and Application*, 2014, 26(5): 679-684 (in Chinese)
- [26] 陈蓉蓉. 光谱法研究四种青蒿素类抗疟药与人血清白蛋白的相互作用[D]. 广州: 暨南大学, 2013: 52-64
- Chen R R. Spectrometric studies on the interaction between four anti-malarial drugs of the artemisinins and human serum albumin [D]. Guangzhou: Jinan University, 2013: 52-64 (in Chinese)
- [27] Gautam P, Upadhyay S K, Hassan W, et al. Transcriptomic and proteomic profile of *Aspergillus fumigatus* on exposure to artemisinin [J]. *Mycopathologia*, 2011, 172(5): 331-346 ◆