

本文引文格式:易雪丽,陈晓颖,韦家柱,等.金银花对金黄色葡萄球菌体外抑菌作用研究[J].右江民族医学院学报,2024,46(1):48-51.

【论著与临床报道】

金银花对金黄色葡萄球菌体外抑菌作用研究

易雪丽,陈晓颖,韦家柱,陈启威,庞艳芳

(右江民族医学院附属医院检验科,广西 百色 533000)

摘要:目的 比较金银花对甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)和甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)体外抑菌活性差异。方法 收集30株MSSA和30株MRSA菌,使用头孢西丁筛选试验和*mecA*基因检测对菌株进行验证,使用琼脂打孔法检测金银花对两类金黄色葡萄球菌的抑菌活性并比较差异,使用琼脂稀释法检测金银花对两类金黄色葡萄球菌的MIC并计算出MIC₅₀。结果 金银花对MSSA和MRSA均有体外抑菌活性且MIC₅₀均为3.125 mg/mL。结论 金银花对MSSA和MRSA均有较好的体外抑菌活性,在临床治疗金黄色葡萄球菌感染方面有很大的应用前景。

关键词:金银花;金黄色葡萄球菌;甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌;甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌

中图分类号:R285 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2024)01-0048-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.01.009

Study on antibacterial effect of *Lonicera Japonica* Thunb on *Staphylococcus aureus* in vitro

Yi Xueli, Chen Xiaoying, Wei Jiazhu, Cheng Qiwei, Pang Yanfang

(Department of Clinical Laboratories, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To compare the difference of antibacterial activity of *Lonicera Japonica* Thunb against Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. **Methods** Thirty strains of MSSA and MRSA were collected and identified by Cefoxitin screening test and *mecA* gene detection, respectively. The agar punch method was used to detect the antibacterial activity of *Lonicera Japonica* Thunb against two types of *Staphylococcus aureus* and compared their differences. Agar dilution method was used to detect the MIC of *Lonicera Japonica* Thunb against two types of *Staphylococcus aureus*, and the MIC₅₀ was calculated. **Results** *Lonicera Japonica* Thunb had in vitro antibacterial activity against both MSSA and MRSA with MIC₅₀ of 3.125 mg/mL. **Conclusion** *Lonicera Japonica* Thunb has a good antibacterial activity against both MSSA and MRSA in vitro, and has great application prospect in the clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection.

Key words: *Lonicera Japonica* Thunb; *Staphylococcus aureus*; Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

金黄色葡萄球菌为革兰阳性球菌,多引起化脓性感染,严重者可以引起败血症,危及患者生命,是社区获得性和院内感染常见的一种重要致病菌。根据金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药性的不同,将其分为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(Methicillin-susceptible

Staphylococcus aureus, MSSA)及甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)。MRSA最常见的耐药机制为携带*mecA*基因,该基因编码的青霉素结合蛋白(PBP2a)出现结构改变^[1]。除了具有抗MRSA活性的头孢菌素

基金项目:百色市本级科学研究与技术开发计划项目(百科20211808)

第一作者:易雪丽,副主任技师,研究方向:临床微生物检验,E-mail:46716155@qq.com

外,临床常用的其他的 β -内酰胺类药物与之亲和力降低,从而导致 MRSA 对该类药物均产生耐药性,因此临床需要根据 MSSA 和 MRSA 耐药性的不同选择不同的抗生素进行治疗。

金银花是忍冬科忍冬属植物忍冬的花蕾,在中国、韩国、日本和印度等国家都有分布,我国主要以河南、河北和山东为主产地^[2]。我国从古代以来一直都将其应用于食用及药用领域,为药食同源植物。古人在三千多年前就已经开始用它防治疾病,东晋时期葛洪最先将其收录于《肘后备急方》。该味药性寒味甘,有清热解毒、抑菌、抗病毒、抗肿瘤及增强免疫力等功能。目前已经制备成银翘解毒片、银黄片、银黄注射液和金银花藤粉等药品应用于临床治疗。然而目前其药用功效尚未得到完全开发,众多研究者仍然不断的探索其在临床领域的新应用。

虽然目前有很多金银花抗金黄色葡萄球菌活性的相关研究,但是少有研究报道探讨金银花对 MSSA 及 MRSA 抑菌活性是否有差异。因此本研究主要目的为探讨金银花对两种金黄色葡萄球菌的抑菌活性是否存在差异,以明确使用金银花治疗由金黄色葡萄球菌引起的感染时是否需要区分 MSSA 及 MRSA,并为后续进一步明确金银花抑菌机制提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 金银花醇提取物购买自广西卓一生物技术有限公司;药敏纸片、Mueller-Hinton (MH)琼脂购自英国 OXOID 公司;血琼脂平板购自郑州安图生物工程股份有限公司;TE 缓冲液购自索莱宝生物科技有限公司;溶葡萄菌素购自生工生物工程有限公司;DNA Marker DL 1000、Premix TaqTM (Ex TaqTM Version 2.0 plus dye) 购自宝生物工程(大连)有限公司;VITEK MS 质谱仪购自法国生物梅里埃公司;PCR 仪及电泳及凝胶成像设备购自美国伯乐公司。

1.2 菌株来源 从右江民族医学院附属医院 2020 年 1 月至 2020 年 6 月临床分离的金黄色葡萄球菌中分别筛选出 30 株 MSSA 和 30 株 MRSA 进行试验。所有菌株均使用 VITEK MS 质谱仪对其进行鉴定,分离菌株于 -80°C 冰箱中保存。

1.3 方法

1.3.1 头孢西丁纸片法筛选 MRSA 菌株 将分离的金黄色葡萄球菌菌株从 -80°C 冰箱中复苏,在血琼脂上培养 16~18 h 后,挑取 1~2 个菌落制备成 0.5 麦氏单位浓度菌悬液,均匀涂布于 MH 琼脂,静置 5 min 后贴一片 30 μg 头孢西丁纸片,35 $^{\circ}\text{C}$ 空气环境孵育 16~18 h 后使用游标卡尺测量抑菌圈直径大小。结果判读参照 CLSI M100, ≤ 21 mm 为 MRSA 菌株, \geq

22 mm 为 MSSA 菌株。

1.3.2 *mecA* 基因检测 将分离的金黄色葡萄球菌菌株在血琼脂上培养 16~18 h 后,挑取 1~2 个菌落于 TE 缓冲液中制备成 0.5 麦氏单位浓度菌悬液,加入 4 μL 溶葡萄菌素,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 20 min; -30°C 放置 10 min;12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液为 DNA 模板备用。参照文献^[3]合成 *mecA* 基因特异性引物对提取的菌株 DNA 进行扩增。引物序列如下:上游引物:5'-AAAATCGATGGTAAAG-GTTGGC-3';下游引物:5'-AGTTCTGCAGTAC-CGGATTTGC-3'。采用 50 μL 的反应体系进行 PCR 扩增,扩增条件:98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪成像后在约 533 bp 位置处出现条带者为阳性结果。阳性扩增产物送至广州艾基生物有限公司测序,测序结果通过美国国立生物技术信息中心网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 blastn 在线比对分析。

1.3.3 金银花对金黄色葡萄球菌抑菌作用初筛试验

参照文献^[5]使用琼脂打孔法进行初筛试验,将 60 株金黄色葡萄球菌在血琼脂上培养 16~18 h 后,挑取 1~2 个菌落制备成 0.5 麦氏单位浓度菌悬液,均匀涂布于 MH 琼脂上。使用打孔器在琼脂上打一个 6 mm 的孔,每孔加入 100 μL 金银花药液(200 mg/mL)。5 $^{\circ}\text{C}$ 空气环境孵育 16~18 h 后使用游标卡尺测量抑菌圈直径大小并比较两组间的差异。

1.3.4 测定金银花对金黄色葡萄球菌的 MIC 使用琼脂稀释法检测金黄色葡萄球菌对金银花的 MIC,将不同浓度的金银花药液加入融化并冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右的 MH 琼脂,制备成终浓度为 200 mg/mL、100 mg/mL、50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL、6.25 mg/mL、3.125 mg/mL、1.563 mg/mL 的药敏 MH 琼脂,将金黄色葡萄球菌配置成 0.5 麦氏单位浓度的菌悬液,再将该菌悬液 1:10 稀释后接种于不同浓度的药敏琼脂平板表面,每点接种菌量约为 10⁴ CFU/mL。35 $^{\circ}\text{C}$ 空气环境孵育 16~20 h 后观察结果,读取抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC 并计算两组的 MIC₅₀。

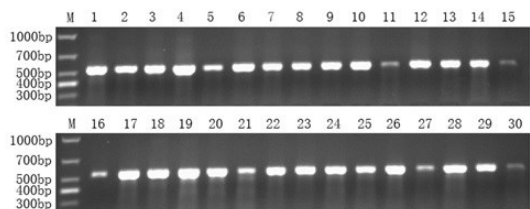
1.4 统计学方法 结果采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 头孢西丁纸片法筛选 MRSA 菌株 使用头孢西丁纸片法从保存的金黄色葡萄球菌中筛选出 30 株 MSSA 和 30 株 MRSA,头孢西丁纸片贴在涂布了菌液的 MH 琼脂上孵育 18 h 后,所有 MSSA 菌株在头

孢西丁纸片周围均形成 ≥ 22 mm 的抑菌圈,所有 MRSA 菌株在头孢西丁纸片周围均形成 ≤ 21 mm 的抑菌圈。

2.2 *mecA* 基因检测 30 株头孢西丁纸片法初筛为 MRSA 的菌株提取 DNA 后使用合成的 *mecA* 基因引物进行扩增,均在约 533 bp 位置处出现条带,见图 1。扩增产物测序结果 blastn 比对分析显示与目的基因 100% 同源。30 株 MSSA 菌株均无扩增条带,未检出 *mecA* 基因。



注: M 为 DL10,00 DNA Marker; 1~30 号为菌株基因组片段扩增产物。

图 1 MRSA 的 *mecA* 基因扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳

2.3 金银花对金黄色葡萄球菌抑菌作用初筛试验的结果 金银花对 MSSA 和 MRSA 均有较好的抑菌活性,两组间的抑菌活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 金银花对 MSSA 和 MRSA 抑菌活性比较的结果

组别	<i>n</i>	抑菌圈直径/mm	<i>t</i>	<i>P</i>
MSSA 组	30	12.05±1.88	0.252	0.802
MRSA 组	30	11.95±1.10		

注:表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

2.4 测定金银花对金黄色葡萄球菌的 MIC 金银花对 MRSA 和 MSSA 的 MIC₅₀ 均为 3.125 mg/mL,见表 2。

表 2 金银花对 MSSA 和 MRSA 的 MIC

MSSA 组 (<i>n</i> = 30)		MRSA 组 (<i>n</i> = 30)	
菌株 编号	MIC/ (mg · mL ⁻¹)	菌株 编号	MIC/ (mg · mL ⁻¹)
0421033	3.125	0420026	3.125
0424013	3.125	0420022	3.125
0426006	3.125	0418073	3.125
0426003	3.125	0418071	3.125
0427007	≤ 1.563	1227075	3.125
0427057	≤ 1.563	0201047	≤ 1.563
0501073	≤ 1.563	1231062	3.125
0502071	3.125	1225055	≤ 1.563
0503074	3.125	0105068	≤ 1.563

表 2(续) 金银花对 MSSA 和 MRSA 的 MIC

MSSA 组 (<i>n</i> = 30)		MRSA 组 (<i>n</i> = 30)	
菌株 编号	MIC/ (mg · mL ⁻¹)	菌株 编号	MIC/ (mg · mL ⁻¹)
0518076	3.125	1222051	≤ 1.563
0519001	3.125	1225029	≤ 1.563
0519109	≤ 1.563	0128047	3.125
0521042	≤ 1.563	0111085	3.125
0522032	≤ 1.563	0129073	3.125
0522071	≤ 1.563	1217116	3.125
0523095	3.125	0129079	3.125
0524031	3.125	1218061	3.125
0525099	3.125	1217098	3.125
0607007	≤ 1.563	0107122	≤ 1.563
0607071	≤ 1.563	1231009	3.125
0608008	3.125	1218053	3.125
0609006	3.125	1227040	3.125
0610032	3.125	0115048	3.125
0610050	3.125	1214023	3.125
0610118	3.125	0116016	≤ 1.563
0611060	≤ 1.563	1222020	3.125
0611105	3.125	1222048	3.125
0617072	≤ 1.563	0114043	3.125
0617094	3.125	0131050	3.125
0620065	3.125	0129081	3.125

3 讨论

金黄色葡萄球菌可产生血浆凝固酶、肠毒素、杀白细胞素、表皮剥脱毒素和休克综合征毒素等多种毒力因子,是社区获得性感染和院内感染常见的一种重要致病菌,可引起人或动物多系统的化脓性感染^[5]。根据对甲氧西林耐药性的不同,选择的治疗药物也不同。一般 MSSA 可选择克林霉素、第一代或者第二代头孢菌素进行治疗,而 MRSA 常使用万古霉素、利奈唑胺或达托霉素等更高级别的抗菌药物进行治疗。然而随着抗生素的广泛应用,临床分离的各类多重耐药菌数量逐年增加。1961 年英国学者首次报道 MRSA 的出现后,世界各地相继报道发现了 MRSA 菌株^[6]。由于 MRSA 菌株对绝大部分 β -内酰胺类药物具有耐药性,因此给临床治疗带来了极大的困难,所以迫切的需要开发更多能应用于 MRSA 临床治疗的新药物。

我国中草药资源丰富,数千年来一直被广泛应用于治疗各类疾病。中草药治疗感染性疾病的不良反应较小,不易引起细菌耐药,价格相对于目前常使用的各类抗生素更便宜,且研究已经证实部分中草药与抗生素联合应用能更有效快速地治疗各类感染,因此近年来众多学者致力于从各类中草药中筛选新型抑菌药物并研究其作用机制^[7]。王杰等^[8]检测了蒲公英、金银花、甘草、决明子、胖大海、香橼和川贝母等 7 种中药水

提物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性,结果显示金银花对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好。朱晓萍等^[9]检测了黄连、黄芩、五倍子和金银花等 17 种中草药对金黄色葡萄球菌的抑菌活性,结果也显示金银花的抑菌活性最佳。本研究结果显示金银花对检测的两类金黄色葡萄球菌均有较好的抑菌活性,与梁晓谊和吕归红两个团队的报道相符合^[10-11]。但是大部分研究在检测金银花对金黄色葡萄球菌抑菌效果的时候没有区分 MSSA 及 MRSA,因此尚未明确临床治疗中,金银花对 MSSA 及 MRSA 是否具有相同的抑菌活性。本研究在检测金银花对金黄色葡萄球菌抑菌活性的同时还比较了其对 MSSA 和 MRSA 抑菌活性的差异,结果显示对两类金黄色葡萄球菌的抑菌活性没有差异,在使用金银花治疗由金黄色葡萄球菌引起的各类感染时不需要区分 MSSA 及 MRSA。同时金银花除了应用于临床治疗之外,还被制成金银花茶及金银花露等饮品,属于药食同源的植物^[12]。鉴于其对人体的副作用极小,且不易产生耐药性,因此在治疗由多重耐药的 MRSA 引起的感染中有极大的应用前景。

虽然本研究与众多报道均显示金银花对金黄色葡萄球菌有较好的抑菌活性,但是其抑菌机制尚未完全明确。金银花主要成分包括有机酸类、黄酮类、挥发油类、多糖、环烯醚萜类和三萜皂苷类等化合物^[13]。这些化合物可以通过破坏细菌的细胞壁和细胞膜、降低细菌黏附、抑制生物膜形成、清除细菌内毒素、降低毒力因子和促进细胞凋亡等多种机制实现其抑菌活性^[14-15]。本研究显示金银花对于携带了 *mecA* 基因的 MRSA 与未携带该基因的 MSSA 的体外抑菌活性无差异,由此可推断金银花抑菌活性的作用位点与 *mecA* 基因编码的 PBP2a 蛋白可能无关,后续本组课题将继续深入探寻金银花的抑菌作用机制。

参考文献:

[1] 陈虹宇,祖莹,罗庆礼,等. 95 例住院患儿耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分离株的分子流行病学特征及药物敏感性[J]. 右江民族医学院学报,2021,43(4):497-502.

[2] 刘艳萍,王云,贾哲,等. 基于 GC-MS 和多元统计方法分析不同产地金银花挥发性成分的差异[J]. 中国中药杂

志,2022,47(20):5508-5519.

[3] 赵焕强,邹玉涵,金姝,等. *tst* 和 *pvl* 基因阳性金黄色葡萄球菌流行情况及分子特征[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(3):353-358.

[4] 谷晓雨,李会,张佩,等. 蒲公英、金银花水提剂及颗粒剂对 4 种致病菌的抑菌作用[J]. 临床合理用药,2023,16(1):5-8.

[5] RAGHURAM V, ALEXANDER A M, LOO H Q, et al. Species-wide phylogenomics of the *Staphylococcus aureus* *Agr* operon revealed convergent evolution of frameshift mutations[J]. *Microbiol Spectr*,2022,10(1):e0133421.

[6] ERIKSEN K R. "Celbenin"-resistant staphylococci[J]. *Ugeskrift Laeger*,1961,123:384-386.

[7] 高磊,童浩文,梁跃辉,等. 基于铜绿假单胞菌群体感应系统的潜在抗菌中草药筛选研究[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(5):772-779,760.

[8] 王杰,乐靖雯,马诗雅,等. 7 种药食同源水提物对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. 现代食品,2023,29(5):197-199,219.

[9] 朱晓萍,庄智威,叶泽铭,等. 黄连等中草药对常见病原菌体外抑菌效果的研究[J]. 饲料研究,2021,44(7):98-101.

[10] 梁晓谊,黄玉环. 9 味中药对儿童呼吸道多重耐药菌的体外药敏试验结果分析[J]. 黑龙江医药,2022,35(1):23-26.

[11] 吕归红,陈宇. 金银花枝叶提取液体外抑菌活性与体内抗炎作用研究[J]. 浙江中医杂志,2021,56(8):620-621.

[12] MA A, ZOU F M, ZHANG R W, et al. The effects and underlying mechanisms of medicine and food homologous flowers on the prevention and treatment of related diseases[J]. *J Food Biochem*,2022,46(12):e14430.

[13] 时玉昌,沈申,陈亚运,等. 不同干燥方法对金银花多元功效成分和感官品质的影响[J]. 生物加工过程,2021,19(1):66-73.

[14] 任涛,庞玉莲,薛诗夏,等. 3 种金银花提取物抗细菌内毒素的作用研究[J]. 现代农业科技,2022(18):150-154.

[15] WANG S G, YAO J Y, ZHOU B, et al. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro[J]. *J Food Prot*,2018,81(1):68-78.

收稿日期:2023-10-22;修回日期:2023-12-02