# 黄绵马酸BB对MRSA和MSSA的体内外抗菌作用研究Δ

陈　聪[1*]，庄素琪[1]，江　涛[2,3]，沈志滨[1]，陈艳芬[1]，司徒莹[1]，杨超燕[1]，唐春萍[1,4#]（1.广东药科大学中药学院，广州　510006；2.广东药科大学实验动物中心，广州　510006；3.广州市新药筛选模型系统建设与应用重点实验室，广州　510006；4.广东省局部精确给药系统工程中心，广州　510006）

**中图分类号**　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）21-2615-07
**DOI**　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.21.10

**摘　要　目的**　探究黄绵马酸BB对皮肤和软组织感染主要致病菌耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌（MSSA）的体内外抗菌作用。**方法**　采用微量稀释法测定黄绵马酸BB对10株MRSA和13株MSSA的最小抑菌浓度（MIC）和最小杀菌浓度（MBC），采用平板法绘制MRSA11和MSSA23菌株的时间-杀菌曲线，采用棋盘稀释法测定黄绵马酸BB与莫匹罗星的联用抑菌效果；建立小鼠皮肤脓肿模型，评价0.5%、1%、2%黄绵马酸BB乳膏对MRSA11、MSSA23菌株的体内抗菌作用；采用扫描电镜观察黄绵马酸BB对MRSA11、MSSA23菌株形态的影响，并检测两种菌株的核酸外渗含量和胞外蛋白含量。**结果**　黄绵马酸BB对10株MRSA的MIC为6.30～80.00 μg/mL，MBC为40.00～640.00 μg/mL；对13株MSSA的MIC为40.00～80.00 μg/mL，MBC为63.50～126.99 μg/mL。黄绵马酸BB干预MRSA11、MSSA23菌株36 h后，杀菌率可达99.9%。黄绵马酸BB与莫匹罗星联用对MRSA菌株的作用为相加，对MSSA菌株的作用为相加或协同。0.5%、1%、2%黄绵马酸BB乳膏均能在一定程度上减小皮肤脓肿模型小鼠皮肤脓肿体积和降低细菌含量（$P<0.05$），改善模型小鼠皮肤脓肿部位的炎症病理变化。黄绵马酸BB可使MRSA11、MSSA23菌体细胞皱缩、破裂以及核酸外渗含量和胞外蛋白含量显著升高（$P<0.01$）。**结论**　黄绵马酸BB对MRSA、MSSA均具有良好的体内外抗菌作用，其机制可能与改变细胞膜通透性有关。

**关键词**　黄绵马酸BB；皮肤和软组织感染；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌；甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌；抗菌；皮肤脓肿

## Study on antibacterial effects of flavaspidic acid BB against MRSA and MSSA *in vitro* and *in vivo*

CHEN Cong[1], ZHUANG Suqi[1], JIANG Tao[2,3], SHEN Zhibin[1], CHEN Yanfen[1], SITU Ying[1], YANG Chaoyan[1], TANG Chunping[1,4]（1. School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Laboratory Animal Center, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangzhou Key Laboratory of New Drug Screening Model System Construction and Application, Guangzhou 510006, China; 4. Guangdong Local Precision Drug Delivery System Engineering Center, Guangzhou 510006, China）

**ABSTRACT　OBJECTIVE** To investigate the antibacterial activities of flavaspidic acid BB against the main pathogens of skin and soft tissue infections such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*（MRSA）and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*（MSSA）*in vitro* and *in vivo*. **METHODS** Microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration（MIC）and minimum bactericidal concentration（MBC）of flavaspidic acid BB on 10 strains of MRSA and 13 strains of MSSA; time-kill curves of MRSA11 and MSSA23 strains were drawn by plate method; the checkerboard dilution method was used to determine the combined antibacterial effect of flavaspidic acid BB and mupirocin; the skin abscess model of mice was established to evaluate the antibacterial effects of 0.5%, 1%, 2% flavaspidic acid BB cream on MRSA11 or MSSA23 strains *in vivo*; scanning electron microscopy was used to observe the effects of flavaspidic acid BB on the morphology of MRSA11 or MSSA23 strains. The contents of nucleic acid leakage and extracellular protein were also determined. **RESULTS** MIC and MBC ranges of flavaspidic acid BB against 10 strains of MRSA were 6.30-80.00 μg/mL and 40.00-640.00 μg/mL; MIC and MBC ranges of 13 strains of MSSA were 40.00-80.00 μg/mL and 63.50-126.99 μg/mL, respectively. The bactericidal rate of MRSA11 and MSSA23 strains were 99.9% after interfered with plavaspidic acid BB for 36 h. The combination of flavaspidic acid BB and mupirocin showed an additive effect on MRSA strain and an additive or synergistic effect on MSSA strain. The 0.5%, 1% and 2% flavaspidic acid BB cream could reduce the volume of abscess and the bacterial load of skin abscess model mice to some extent（$P<0.05$）, and improved the pathological changes of skin inflammation in skin abscess site of mice. Flavaspidic acid BB could make MRSA11 and MSSA23 cells shrinkage and rupture, and significantly increase the contents of nucleic acid leakage and extracellular protein（$P<0.01$）. **CONCLUSIONS** Flavaspidic acid BB shows good antibacterial effect on MRSA and MSSA *in vitro* and *in vivo*, the mechanism of which may be related

Δ**基金项目**　广东省省级科技计划项目（No.2015B020234009）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药药效评价与临床应用。E-mail：1045002556@qq.com

＃**通信作者**　教授，硕士生导师。研究方向：中药药效与安全性评价。E-mail：tchp66@163.com

to the change of membrane permeability.

**KEYWORDS** flavaspidic acid BB; skin and soft tissue infections; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; antibacterial activity; skin abscess

皮肤和软组织感染（skin and soft tissue infection，SSTI）为外科常见的感染性疾病，金黄色葡萄球菌是其最主要的致病菌[1－2]。抗生素的出现使SSTI得到了有效控制，但随着抗生素的广泛应用，具有多重耐药性特征的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）在全球广泛流行[3－4]。目前临床上用于治疗SSTI的局部外用抗生素主要有红霉素、夫西地酸、莫匹罗星等[2]，而MRSA对红霉素具有高度耐药性，耐药率高达85%[5]，MRSA和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌（methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*，MSSA）对夫西地酸、莫匹罗星的敏感性在全球部分地区也呈现明显的下降趋势[6－7]。近年来，研究发现许多天然产物具有较好的抗菌效果[8－9]，因此从天然产物中寻找新的治疗SSTI的药物具有重要意义。

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans*（L.）Schott为鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物，民间常用香鳞毛蕨的水提液涂搽患处来治疗牛皮癣、皮疹、皮炎、痤疮等[10]。本课题组前期研究发现，香鳞毛蕨中含量最高的间苯三酚类单体化合物黄绵马酸BB（其化学结构式见图1）对皮肤癣菌（如红色毛癣菌）[11]、SSTI致病菌（如金黄色葡萄球菌）[12－13]均具有较好的体外抗菌活性。基于此，本研究采用平板法、棋盘稀释法以及小鼠皮肤脓肿模型进一步综合评价黄绵马酸BB对金黄色葡萄球菌（MRSA和MSSA）的体内外抗菌作用及机制，以期为该化合物的开发及利用提供参考。

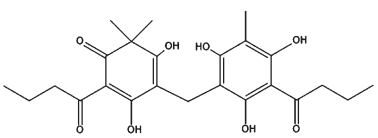


**图1 黄绵马酸BB的化学结构式**

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有BKQ-Z301型高压灭菌锅（广州浩翰仪器有限公司），E-1010型电热恒温恒湿培养箱（德国Memmert公司），SW-CJ-1F型超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司），Infinite 200 PRO型多功能酶标仪（瑞士Tecan公司），E-1010型离子溅射仪、S-3400N型扫描电镜（日本Hitachi公司）。

### 1.2 主要药品与试剂

黄绵马酸BB由广东药科大学中药学院中药化学教研室提供，批号为GC-CZ-1809010，纯度大于98%；莫匹罗星对照品（批号N0825A，纯度大于99%）、莫匹罗星软膏（批号18010176）均购自中美天津史克制药有限公司；红霉素对照品（批号M0726A，纯度大于99%）购自大连美仑生物技术有限公司；夫西地酸对照品（批号Z19J6Q1，纯度大于99%）购自上海源叶生物科技有限公司；头孢西丁钠对照品（批号YQ200524，纯度大于99%）购自深圳信立泰药业股份有限公司；CAMHB肉汤培养基（批号3302092）、营养琼脂培养基（批号1067752）均购自广东环凯微生物科技有限公司。

### 1.3 菌株

金黄色葡萄球菌ATCC29213（质控菌株）购自广东省微生物菌种保藏中心。10株MRSA（编号MRSA11～MRSA20）和13株MSSA（编号MSSA23～MSSA28、MSSA32～MSSA38）均由广东莱恩医药研究院有限公司惠赠。

### 1.4 动物

本研究所用动物为SPF级KM小鼠，雌性，体质量18～22 g，购自广东省医学实验动物中心，动物生产许可证号为SCXK（粤）2018-0002。小鼠饲养环境符合SPF标准，温度为20～25 ℃，相对湿度为40%～70%。本动物实验经广东药科大学实验动物伦理委员会审查并批准执行（批准号为gdpulac2019215）。

## 2 方法

### 2.1 黄绵马酸BB对受试菌株的体外抗菌作用考察

2.1.1 菌液的制备 受试菌株在CAMHB肉汤培养基中复苏18～24 h，再接种于营养琼脂培养基上，于35 ℃恒温培养18～24 h至对数生长期，然后用0.9%无菌生理盐水快速吹打菌落，收集菌液，用麦氏比浊管法调整菌液浓度至$1.0\times10^8$ CFU/mL，备用。

2.1.2 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度的测定 采用CLSI M07-A9方案中微量稀释法进行测定。将受试菌菌液浓度调整至$1.0\times10^6$ CFU/mL，取100 μL接种于96孔板中，再加入100 μL各药物的倍比稀释溶液（黄绵马酸BB、莫匹罗星、红霉素、夫西地酸的终质量浓度范围分别为2.5～1 280.0、0.062 5～5 120、0.125～5 120、0.012 5～5 120 μg/mL），于35 ℃培养18～24 h，肉眼观察孔内受试菌的生长情况，若孔内无细菌生长，则该孔对应的浓度即为药物的最小抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）。从未见细菌生长的孔中取20 μL液体涂于营养琼脂培养基上，于35 ℃培养18～24 h，肉眼观察培养基上受试菌的生长情况，若培养基上无细菌生长，则该孔对应的浓度即为药物的最小杀菌浓度（minimum bactericidal concentration，MBC）。每次实验均使用金黄色葡萄球菌ATCC29213作为质控菌株，头孢西丁作为质控药物，若测得头孢西丁的MIC范围为1～4 μg/mL，则该方法可靠。以上操作重复3次，测定结果用几何均值表示。

2.1.3　时间-杀菌曲线的绘制　选择对黄绵马酸BB敏感且稳定性好的MRSA11和MSSA23作为受试菌，并将受试菌菌液浓度调整至$1.0\times10^6$ CFU/mL，然后设置黄绵马酸BB中、高浓度组（浓度分别为MIC、2MIC），同时设置对照组和莫匹罗星中、高浓度组（浓度分别为MIC、2MIC）。在试管中加入各组药液1.0 mL后再加入等量菌液（对照组仅含菌液不含药液），于35 ℃振荡培养。分别在培养0、1、2、4、6、8、12、16、20、24、36 h时取样，采用平板法计算活菌数并绘制时间-杀菌曲线。杀菌作用的判定标准：细菌存活数从初始接种数量下降≥3 lg CFU/mL时，则认为杀菌率达99.9%，药物在该浓度下对受试菌有杀菌作用[14]。

2.1.4　黄绵马酸BB与莫匹罗星的联合抑菌实验　根据“2.1.2”项下的测定结果，选择抑菌效果较好的黄绵马酸BB和莫匹罗星进行联合抑菌实验，采用棋盘微量稀释法[15]进行检测。根据药物单用时对受试菌的MIC值，将黄绵马酸BB（A药）和莫匹罗星（B药）的最大给药浓度设定为2MIC，分别在96孔板的横向和纵向进行一系列二倍稀释，然后各孔加入等量菌液（菌液浓度为$1.0\times10^6$ CFU/mL），于35 ℃培养18～24 h，根据“2.1.2”项下方法测定各药物联合后的MIC。以上操作重复3次。以联合抑菌指数（fractional inhibitory concentration index，FICI）作为联合抑菌结果的判断依据：FICI≤0.5为协同作用，0.5＜FICI≤1为相加作用，1＜FICI≤2为无关作用，FICI＞2为拮抗作用[16]。FICI的计算方式如下：$FICI=FIC_{A药}+FIC_{B药}$，$FIC_{A药}=MIC_{A药联合}/MIC_{A药单用}$，$FIC_{B药}=MIC_{B药联合}/MIC_{B药单用}$。

### 2.2　黄绵马酸BB乳膏对皮肤脓肿模型小鼠的改善作用考察

2.2.1　黄绵马酸BB乳膏的制备　参考文献[17]方法制备黄绵马酸BB乳膏：称取凡士林6 g、液体石蜡8 g、十八醇5 g、单硬脂酸甘油酯7 g、脂肪醇聚氧乙烯醚4 g、月桂氮酮1 g、对羟基苯甲酸甲酯0.3 g、对羟基苯甲酸丙酯0.2 g、2，6-二叔丁基对甲酚0.5 g，加热至80 ℃溶解，搅匀；降温至65 ℃时，加入黄绵马酸BB粉末0.5 g搅拌溶解，作为油相，备用。另外称取甘油12 g、乙二胺四乙酸二钠0.02 g，加适量纯化水（乳膏总量为100 g），加热至65 ℃溶解，作为水相，备用。将油相缓缓倒入水相中，边加边搅拌至室温，即得0.5%黄绵马酸BB乳膏。同法制备1%、2%黄绵马酸BB乳膏及不含药物的基质，于4 ℃保存，备用。

2.2.2　造模、分组及给药　分别建立以MRSA11或MSSA23感染的小鼠皮肤脓肿模型：将小鼠背部脱毛、消毒后，取60只皮下注射MRSA11（菌液浓度为$1.0\times10^9$ CFU/mL），另外60只皮下注射MSSA23（菌液浓度为$5.0\times10^8$ CFU/mL），注射体积均为0.1 mL。造模次日，观察小鼠背部皮肤，若出现脓包、红肿，则表明造模成功。将造模成功的两种感染小鼠均随机分为基质组、莫匹罗星软膏组和0.5%、1%、2%黄绵马酸BB乳膏组，每组12只。每天早晚各涂药1次，每次涂药量为0.1 g/只，连续给药10 d。

2.2.3　小鼠皮肤脓肿体积的测定　各组小鼠给药后，每隔1天测量1次皮肤脓肿的长径（$L$）与宽径（$W$），并计算脓肿体积（$V$），具体公式为$V=(\pi/6)\cdot L\cdot W^2$。

2.2.4　小鼠皮肤脓肿部位细菌含量的检测　实验第11天脱臼处死小鼠，取脓肿部位皮肤0.1 g（剩余部分用于病理切片的制备），加入9倍量无菌生理盐水后，用组织捣碎机研磨制成皮肤匀浆液。将皮肤匀浆液稀释100倍，取20 μL均匀涂于营养琼脂培养基上，于35 ℃培养24 h后，肉眼观察培养基上的菌落数。

2.2.5　小鼠皮肤脓肿部位的病理形态学观察　取各组小鼠脓肿部位皮肤，按常规方法制备病理切片，以苏木精伊红染色，采用光学显微镜观察小鼠的皮肤病理形态学变化。

### 2.3　黄绵马酸BB对MRSA及MSSA的作用机制考察

2.3.1　黄绵马酸BB对两种细菌形态的影响考察　参考文献[18]方法，将MRSA11、MSSA23菌株培养至对数生长期后，调整菌液浓度为$1.0\times10^6$ CFU/mL，再分别接种于不同的6孔板上（每孔1 mL），然后分为对照组和黄绵马酸BB低、中、高浓度组（浓度分别为1/2MIC、MIC和2MIC）。除对照组不加药物外，其余各组均加入1 mL相应药液，于35 ℃培养4 h后，以5 000 r/min离心10 min；收集菌体，加入2.5%戊二醛溶液1 mL，置于4 ℃固定4 h，然后采用扫描电镜观察MRSA11和MSSA23的形态。

2.3.2　黄绵马酸BB对两种细菌核酸外渗含量的影响考察　参考文献[19]方法，将MRSA11、MSSA23菌株培养至对数生长期后，调整菌液浓度为$1.0\times10^6$ CFU/mL，再按“2.3.1”项下方法分组、加药、培养、离心后，取上清液，采用酶标仪于260 nm处测定吸光度值，吸光度值越大，表明细菌核酸外渗含量越高。

2.3.3　黄绵马酸BB对两种细菌胞外蛋白含量的影响考察　参考文献[20]方法，取0、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μg/mL的牛血清蛋白标准溶液各200 μL，加入5 mL考马斯亮蓝溶液，室温放置5 min；采用酶标仪于595 nm波长处测定吸光度值，以牛血清蛋白质量浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。将MRSA11、MSSA23菌株培养至对数生长期后，调整菌液浓度为$1.0\times10^6$ CFU/mL，再按“2.3.1”项下方法分组、加药、培养、离心后，取上清液200 μL，加入5 mL考马斯亮蓝溶液，室温放置5 min；采用酶标仪于595 nm波长处测定吸光度值，然后将吸光度值代入标准曲线计算，即得蛋白含量。

### 2.4　统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计学分析，数据均用$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析。检验水准$\alpha=0.05$。

## 3 结果

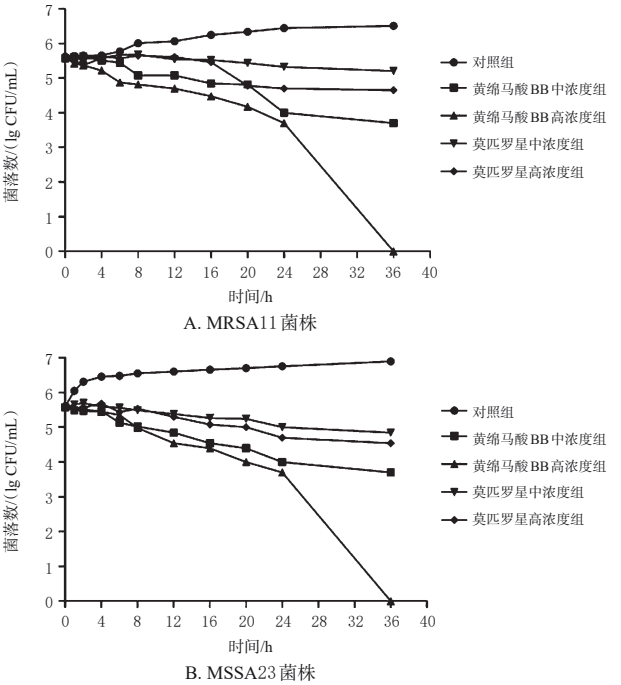
### 3.1 黄绵马酸BB对受试菌株的体外抗菌作用

3.1.1 受试菌的MIC和MBC 如表1所示，黄绵马酸BB对10株MRSA的MIC为6.30～80.00 μg/mL，MBC为40.00～640.00 μg/mL；对13株MSSA的MIC为40.00～80.00 μg/mL，MBC为63.50～126.99 μg/mL。莫匹罗星对10株MRSA的MIC为0.16～80.00 μg/mL，MBC为0.20～1 280.00 μg/mL，而该药对葡萄球菌属的耐药标准为MIC≥8.00 μg/mL[6]，这表明MRSA12、MRSA13、MRSA16对莫匹罗星耐药。红霉素对10株MRSA的MIC≥2 560.00 μg/mL，而该药对葡萄球菌属的耐药标准为MIC≥8.00 μg/mL[21]，这表明10株MRSA对红霉素均高度耐药。夫西地酸对10株MRSA的MIC均为2 560.00 μg/mL，而该药对葡萄球菌属的耐药标准为MIC≥2.00 μg/mL[7]，这表明10株MRSA对夫西地酸均有耐药性。另外，MSSA25、MSSA32、MSSA34对红霉素耐药，MSSA37对夫西地酸耐药。头孢西丁对金黄色葡萄球菌ATCC29213（质控菌株）的MIC为1.0 μg/mL，表明本检测结果可信。

**表1 受试菌株MIC和MBC的测定结果（$n$=3，μg/mL）**

| 菌株 | 黄绵马酸BB | | 莫匹罗星 | | 红霉素 | | 夫西地酸 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC |
| MRSA11 | 40.00 | 40.00 | 0.16 | 2.50 | >2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | 2 560.00 |
| MRSA12 | 50.40 | 640.00 | 80.00 | 1 280.00 | >2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | 2 560.00 |
| MRSA13 | 31.75 | 126.99 | 20.00 | 507.97 | 2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | >2 560.00 |
| MRSA14 | 50.40 | 80.00 | 0.16 | 2.50 | 2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | >2 560.00 |
| MRSA15 | 20.00 | 40.00 | 0.25 | 2.50 | >2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | 2 560.00 |
| MRSA16 | 50.40 | 160.00 | 20.00 | 640.00 | >2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | 2 560.00 |
| MRSA17 | 80.00 | 126.99 | 0.16 | 3.15 | 2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | >2 560.00 |
| MRSA18 | 6.30 | 40.00 | 0.20 | 3.15 | >2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | 2 560.00 |
| MRSA19 | 40.00 | 40.00 | 0.16 | 3.97 | >2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | >2 560.00 |
| MRSA20 | 80.00 | 100.79 | 0.20 | 0.20 | 2 560.00 | >2 560.00 | 2 560.00 | >2 560.00 |
| MSSA23 | 40.00 | 80.00 | 0.13 | 8.00 | 0.16 | 1.98 | 0.31 | 2.50 |
| MSSA24 | 50.40 | 80.00 | 0.13 | 6.35 | 0.25 | 3.15 | 0.03 | 1.98 |
| MSSA25 | 50.40 | 63.50 | 0.13 | 5.04 | 15.87 | 40.00 | 0.02 | 2.50 |
| MSSA26 | 80.00 | 100.79 | 0.13 | 4.00 | 0.16 | 1.98 | 1.25 | 2.50 |
| MSSA27 | 40.00 | 80.00 | 0.25 | 6.35 | 0.16 | 1.57 | 0.04 | 1.98 |
| MSSA28 | 63.50 | 126.99 | 0.13 | 8.00 | 0.31 | 5.00 | 0.04 | 2.50 |
| MSSA32 | 40.00 | 63.50 | 0.13 | 5.04 | >2 560.00 | >2 560.00 | 0.04 | 1.98 |
| MSSA33 | 63.50 | 63.50 | 0.13 | 4.00 | 0.16 | 1.25 | 0.06 | 1.98 |
| MSSA34 | 63.50 | 63.50 | 0.16 | 5.04 | >2 560.00 | >2 560.00 | 0.02 | 2.50 |
| MSSA35 | 50.40 | 80.00 | 0.13 | 6.35 | 0.16 | 2.50 | 0.02 | 2.50 |
| MSSA36 | 40.00 | 63.50 | 0.20 | 2.52 | 0.20 | 1.98 | 0.99 | 2.50 |
| MSSA37 | 50.40 | 80.00 | 0.08 | 3.17 | 0.16 | 1.57 | 2.50 | 2.50 |
| MSSA38 | 50.40 | 100.79 | 0.13 | 5.04 | 0.31 | 2.50 | 0.02 | 1.98 |

3.1.2 MRSA11和MSSA23的时间-杀菌曲线 如图2所示，对照组菌落数持续缓慢增长；黄绵马酸BB中浓度组2种菌的菌落数均略有波动，整体随着培养时间的延长呈逐渐下降趋势，6 h后菌落数少于莫匹罗星各浓度组，但36 h时仍有细菌生长；黄绵马酸BB高浓度组MRSA11（培养2 h后）、MSSA23（培养8 h后）的菌落数一直低于其他各组，36 h时减少的菌落数>3 lg CFU/mL，表明其杀菌率达99.9%。莫匹罗星各浓度组2种菌的菌落数随时间延长有下降趋势，但在实验时间内均未达99.9%的杀菌率。




A. MRSA11菌株




B. MSSA23菌株

**图2 MRSA11、MSSA23菌株的时间-杀菌曲线**

3.1.3 黄绵马酸BB与莫匹罗星的联合抑菌作用 如表2所示，黄绵马酸BB和莫匹罗星联用时，对10株MRSA菌株的作用为相加，对MSSA34和MSSA38菌株的作用为协同，对其余MSSA菌株的作用为相加。

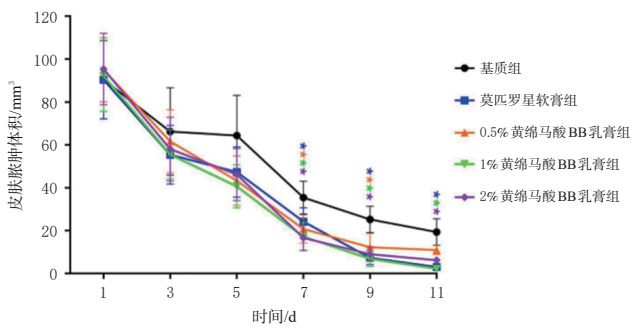
**表2 黄绵马酸BB与莫匹罗星的联合抑菌结果**

| 菌株 | $FIC_{A药}$ | $FIC_{B药}$ | FICI | 作用效应 |
|---|---|---|---|---|
| MRSA11 | 0.500 | 0.031 | 0.531 | 相加 |
| MRSA12 | 0.125 | 0.500 | 0.625 | 相加 |
| MRSA13 | 0.250 | 0.500 | 0.750 | 相加 |
| MRSA14 | 0.125 | 0.500 | 0.625 | 相加 |
| MRSA15 | 0.125 | 0.500 | 0.625 | 相加 |
| MRSA16 | 0.125 | 0.500 | 0.625 | 相加 |
| MRSA17 | 0.500 | 0.125 | 0.625 | 相加 |
| MRSA18 | 0.250 | 0.500 | 0.750 | 相加 |
| MRSA19 | 0.500 | 0.125 | 0.625 | 相加 |
| MRSA20 | 0.250 | 0.500 | 0.750 | 相加 |
| MSSA23 | 0.250 | 0.500 | 0.750 | 相加 |
| MSSA24 | 0.125 | 0.500 | 0.625 | 相加 |
| MSSA25 | 0.500 | 0.125 | 0.625 | 相加 |
| MSSA26 | 0.500 | 0.125 | 0.625 | 相加 |
| MSSA27 | 0.125 | 0.500 | 0.625 | 相加 |
| MSSA28 | 0.250 | 0.500 | 0.750 | 相加 |
| MSSA32 | 0.500 | 0.125 | 0.625 | 相加 |
| MSSA33 | 0.250 | 0.500 | 0.750 | 相加 |
| MSSA34 | 0.250 | 0.064 | 0.314 | 协同 |
| MSSA35 | 0.500 | 0.250 | 0.750 | 相加 |
| MSSA36 | 0.500 | 0.250 | 0.750 | 相加 |
| MSSA37 | 0.125 | 0.500 | 0.625 | 相加 |
| MSSA38 | 0.250 | 0.250 | 0.500 | 协同 |

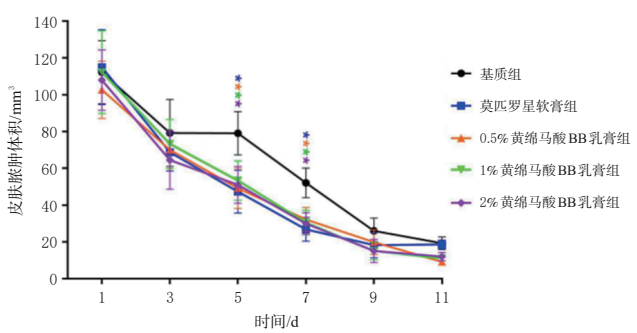
A药：黄绵马酸BB；B药：莫匹罗星

### 3.2 黄绵马酸BB乳膏对皮肤脓肿模型小鼠的改善作用

3.2.1 小鼠皮肤脓肿体积 如图3所示，造模1 d后，小鼠背部形成的脓肿体积达到峰值，并随时间的延长逐渐减小。经MRSA11感染后，与基质组相比，莫匹罗星软膏组和1%、2%黄绵马酸BB乳膏组小鼠在给药第7、9、11天时的皮肤脓肿体积显著减小（$P<0.05$），0.5%黄绵马酸BB乳膏组小鼠在给药第7、9天时的皮肤脓肿体积显著减小（$P<0.05$）。经MSSA23感染后，与基质组比较，各给药组小鼠在给药第5、7天时的皮肤脓肿体积显著减小（$P<0.05$）。




A. MRSA11菌株

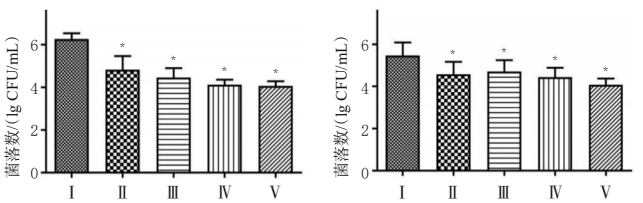



B. MSSA23菌株

不同颜色的*表示对应组与基质组相比，$P<0.05$

**图3 各组小鼠皮肤脓肿体积的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）**

3.2.2 小鼠皮肤脓肿部位的细菌含量 如图4所示，与基质组比较，各给药组小鼠皮肤脓肿部位培养出的菌落数均显著减少（$P<0.05$）。




A. MRSA11菌株　　B. MSSA23菌株

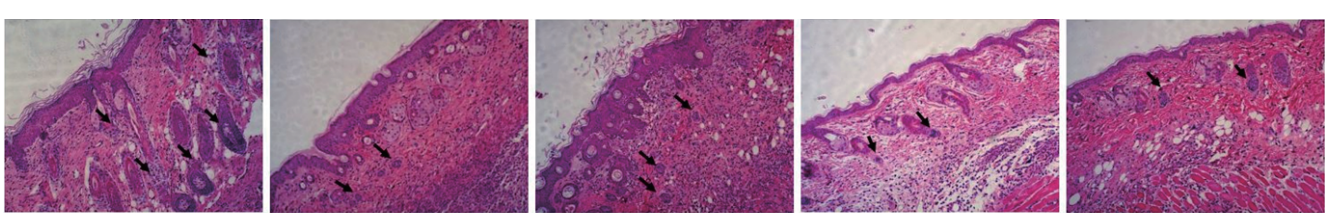
Ⅰ：基质组；Ⅱ：莫匹罗星软膏组；Ⅲ：0.5%黄绵马酸BB乳膏组；Ⅳ：1%黄绵马酸BB乳膏组；Ⅴ：2%黄绵马酸BB乳膏组；*：与基质组相比，$P<0.05$

**图4 各组小鼠皮肤脓肿部位细菌含量的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）**

3.2.3 小鼠皮肤脓肿部位的病理形态学 基质组小鼠表皮层、真皮层以及皮下组织的层次较为模糊，毛囊及皮脂腺周围炎症细胞浸润明显。莫匹罗星软膏组小鼠皮肤组织层次模糊，真皮层内有少量炎症细胞浸润。0.5%黄绵马酸BB乳膏组小鼠真皮层组织间隙炎症细胞浸润明显；1%、2%黄绵马酸BB乳膏组小鼠表皮层、真皮层以及皮下组织结构基本完整，层次较清晰，真皮层内炎症细胞浸润程度较基质组明显减轻。结果见图5。

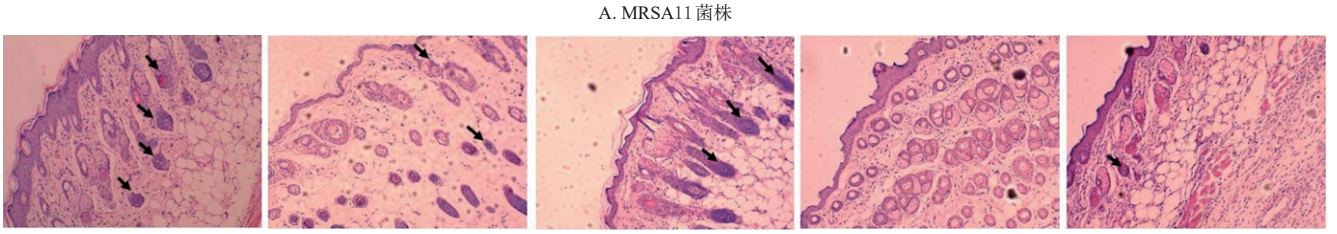
### 3.3 黄绵马酸BB对MRSA和MSSA的作用机制

3.3.1 MRSA11和MSSA23的形态 如图6所示，未经处理的MRSA11和MSSA23菌体完整，细胞表面光滑且形态饱满，无破裂。黄绵马酸BB低浓度组两种细菌均出现皱缩变形；黄绵马酸BB中浓度组两种细菌均严重变形，部分菌体破裂，细胞碎片及溶出物增多；黄绵马酸BB高浓度组两种细菌的大部分细胞均破裂，碎片呈不规则片状或团状。



a. 基质组　b. 莫匹罗星软膏组　c. 0.5%黄绵马酸BB乳膏组　d. 1%黄绵马酸BB乳膏组　e. 2%黄绵马酸BB乳膏组

A. MRSA11菌株

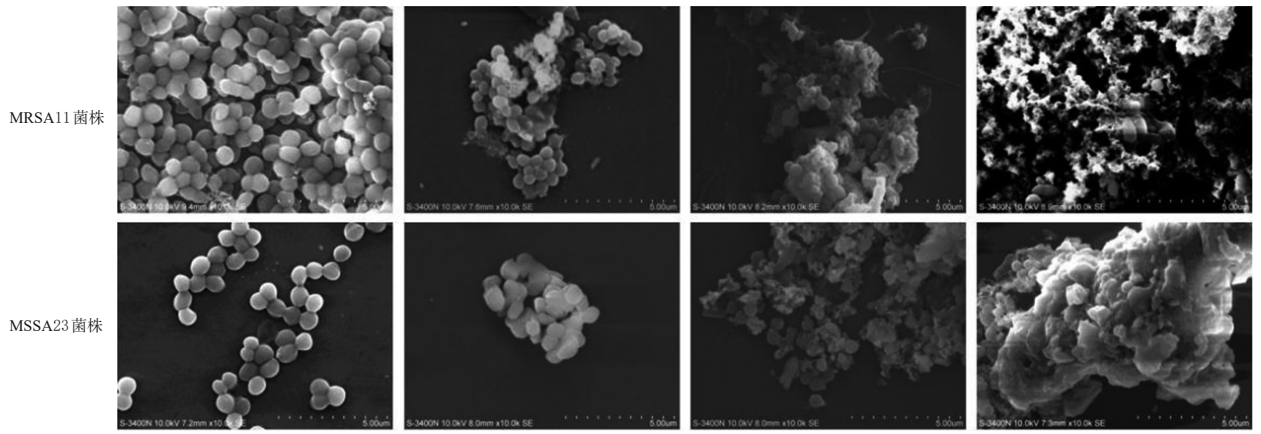


a. 基质组　b. 莫匹罗星软膏组　c. 0.5%黄绵马酸BB乳膏组　d. 1%黄绵马酸BB乳膏组　e. 2%黄绵马酸BB乳膏组

B. MSSA23菌株

→：炎症细胞浸润

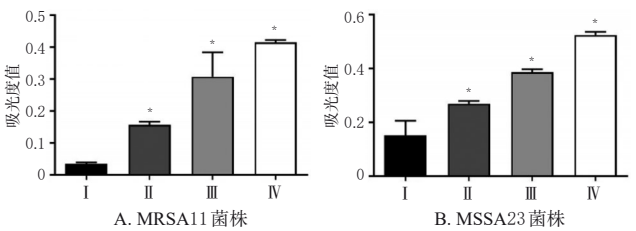
**图5 小鼠皮肤脓肿部位的病理形态学观察结果（×100）**




A.对照组　B.黄绵马酸BB低浓度组　C.黄绵马酸BB中浓度组　D.黄绵马酸BB高浓度组

**图6　MRSA11和MSSA23菌株的形态观察结果**

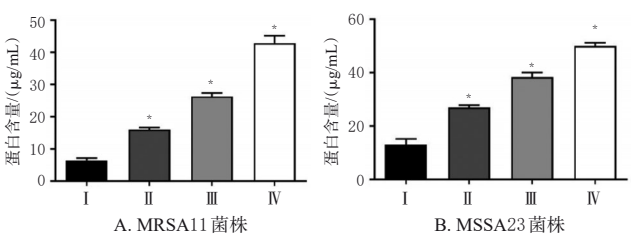
3.3.2　两种细菌核酸外渗含量　如图7所示，与对照组相比，黄绵马酸BB各浓度组MRSA11、MSSA23菌株核酸外渗含量均显著升高（$P<0.01$）。




Ⅰ：对照组；Ⅱ：黄绵马酸BB低浓度组；Ⅲ：黄绵马酸BB中浓度组；Ⅳ：黄绵马酸BB高浓度组；*：与对照组相比，$P<0.01$

**图7　两种细菌核酸外渗含量的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）**

3.3.3　两种细菌胞外蛋白含量　如图8所示，与对照组相比，黄绵马酸BB各浓度组MRSA11、MSSA23菌株胞外蛋白含量均显著升高（$P<0.01$）。




Ⅰ：对照组；Ⅱ：黄绵马酸BB低浓度组；Ⅲ：黄绵马酸BB中浓度组；Ⅳ：黄绵马酸BB高浓度组；*：与对照组相比，$P<0.01$

**图8　两种细菌胞外蛋白含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）**

## 4　讨论

金黄色葡萄球菌引起的皮肤感染持续时间长，易反复感染，难以痊愈，且随着大量抗菌药物的广泛应用，其耐药菌株不断产生，加大了治疗难度[22－23]。相关研究发现，香鳞毛蕨的间苯三酚类化合物具有较好的抗菌活性[24]。本研究发现，黄绵马酸BB对多株MRSA和MSSA均具有良好的体外抑菌和杀菌作用。黄绵马酸BB对MRSA的MIC范围较广，这可能与不同菌株对药物的敏感性存在差异有关。时间-杀菌曲线结果显示，MIC的黄绵马酸BB可明显抑制MRSA11和MSSA23的生长，2MIC的黄绵马酸BB作用于MRSA11和MSSA23 36 h后可达到99.9%的杀菌率，这提示黄绵马酸BB的杀菌作用具有浓度依赖性。莫匹罗星是目前临床上治疗SSTI最常用的局部外用抗菌药物[2]，与黄绵马酸BB联用后，可对部分MSSA菌株产生协同作用。

目前，中药抗菌作用的研究主要是进行体外抗菌活性评价，对体内的研究较少，而药物应用于体内时会发生一系列复杂的生理变化，仅凭单纯的体外实验不能够全面评价药物的疗效[8－9]。因此，本研究以皮下注射金黄色葡萄球菌的方法复制小鼠皮肤脓肿模型，来评价黄绵马酸BB的体内抗菌活性。结果显示，0.5%、1%、2%黄绵马酸BB乳膏均能减小经MRSA、MSSA感染后小鼠的皮肤脓肿体积；对小鼠给药11 d后的皮肤脓肿部位进行细菌培养发现，两种细菌的菌落数相比于对照组均显著减少。病理学观察结果显示，1%、2%黄绵马酸BB乳膏组小鼠皮肤表皮层、真皮层以及皮下组织结构基本完整，层次清晰，真皮层内炎症细胞浸润程度明显减轻。以上结果提示，黄绵马酸BB可在一定条件下加快皮肤脓肿的恢复进程，抑制脓肿组织内细菌的生长。

扫描电镜的结果显示，黄绵马酸BB可引起MRSA11和MSSA23细胞皱缩、破裂。当细菌细胞膜通透性改变时，细胞内DNA、RNA等大分子物质会泄漏到胞外，这些成分可于260 nm波长处检测到吸光度值，是细胞膜损伤的标志[25]。蛋白质分子比核酸大，如果蛋白质能泄露到细胞外，就能更好地反映细胞膜受损的程度[20]。本研究结果显示，经黄绵马酸BB处理后，MRSA11、MSSA23菌株的核酸外渗含量和胞外蛋白含量均显著升高，且具有浓度依赖性，这表明黄绵马酸BB可通过破坏MRSA、MSSA菌株细胞膜的通透性，使细菌无法维持正常生命活动从而达到抑菌效果。

综上所述，黄绵马酸BB对SSTI的主要致病菌MRSA和MSSA均具有良好的体内外抗菌作用，其作用机制可能与改变细胞膜通透性有关。

## 参考文献


[1] PETRAKIS V, PANAGOPOULOS P, PAPANAS N. Dalbavancin for the treatment of complicated gram-positive skin and soft tissue infections[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2020, 19(3): 236-241.

[2] 姬粉芝. 金黄色葡萄球菌感染性皮肤病的外用抗生素选择[J]. 皮肤病与性病, 2018, 40(1): 107-108.

[3] BARBER M. Methicillin-resistant staphylococci[J]. J Clin Pathol, 1961, 14: 385-393.

[4] 武杰, 赵建平. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分型方法研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(2): 235-240.

[5] ELFEKY D S, AWAD A R, ELSHOBAKY M A, et al. Effect of ceftaroline, vancomycin, gentamicin, macrolides, and ciprofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: an *in vitro* study[J]. Surg Infect (Larchmt), 2020, 21(2): 150-157.

[6] YU F Y, LIU Y L, LU C H, et al. Dissemination of fusidic acid resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates[J]. BMC Microbiol, 2015, 15: 210.

[7] DADASHI M, HAJIKHANI B, DARBAN-SAROKHALIL D, et al. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: a systematic review and meta-analysis[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 20: 238-247.

[8] 翟贯星, 陆璐, 陈代杰, 等. 中药化合物的抗菌及增效作用[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(12): 1366-1370.

[9] 王梁凤, 李慧婷, 陈青垚, 等. 中药挥发油抗菌作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1026-1033.

[10] 韩旭阳, 曾祖平, 何秀娟, 等. 香鳞毛蕨中1个新的间苯三酚苷类化合物[J]. 中草药, 2022, 53(1): 14-17.

[11] 梁玉婷, 宋国强, 林楚怡, 等. 香鳞毛蕨化学成分及其体外抗浅部真菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1758-1763.

[12] 殷川平, 陈文浩, 莫梓童, 等. 黄绵马酸BB对皮肤软组织感染致病菌的抗菌活性及机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1662-1667.

[13] 莫梓童, 吴小诗, 殷川平, 等. 黄绵马酸BB对革兰阳性致病菌的抗菌活性和生物被膜清除作用研究[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2324-2330.

[14] SKARIYACHAN S, MUDDEBIHALKAR A G, BADRINATH V, et al. Natural epiestriol-16 act as potential lead molecule against prospective molecular targets of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*-insight from in silico modelling and *in vitro* investigations[J]. Infect Genet Evol, 2020, 82: 104314.

[15] PURKAIT S, BHATTACHARYA A, BAG A, et al. Evaluation of antibiofilm efficacy of essential oil components β-caryophyllene, cinnamaldehyde and eugenol alone and in combination against biofilm formation and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*[J]. Lett Appl Microbiol, 2020, 71(2): 195-202.

[16] 周晓元, 罗润齐, 王俊洁, 等. 盐酸小檗碱联合喹诺酮对产超广谱β内酰胺酶肺炎克雷伯菌的体外抑菌作用的研究[J]. 现代医院, 2021, 21(10): 1613-1618.

[17] 梁玉婷, 刘小赟, 潘敬灵, 等. 不同透皮吸收促进剂对黄绵马酸BB乳膏体外透皮吸收的影响[J]. 中国药房, 2020, 31(5): 590-594.

[18] WU T, HUANG Y N, CHEN Y J, et al. Antibacterial effect of (2E, 2E)-4, 4-trisulfanediylbis(but-2-enoic acid) against *Staphylococcus aureus*[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0197348.

[19] HU W, LI C Z, DAI J M, et al. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. Ind Crops Prod, 2019, 130: 34-41.

[20] HE N, WANG P Q, WANG P Y, et al. Antibacterial mechanism of chelerythrine isolated from root of *Toddalia asiatica* (Linn) Lam[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 261.

[21] LIU Q Q, HAN J, ZUO G Y, et al. Potentiation activity of multiple antibacterial agents by Salvianolate from the Chinese medicine Danshen against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. J Pharmacol Sci, 2016, 131(1): 13-17.

[22] 江炜, 邹国发, 古炽明, 等. 小鼠皮肤脓肿模型构建及多枝雾水葛的药效评价[J]. 医药导报, 2020, 39(3): 298-304.

[23] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2019年CHINET三级医院细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(3): 233-243.

[24] 朱冲冲, 彭冰, 曾祖平, 等. 香鳞毛蕨的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(10): 1418-1423.

[25] 孙宇豪, 陈恬, 林皓楠, 等. 截短侧耳素衍生物ZYY-12h对MRSA菌株的抑菌作用及作用机制研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(1): 22-27.



(收稿日期: 2022-04-01　修回日期: 2022-09-12)

(编辑: 唐晓莲)