doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2020.01.10

不同中草药提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抑菌效果研究

刘承鑫[1],崔明全[2],颜本立[3],张辉华[1],王鹤佳[2],朱馨乐[2],
刘　燊[1],李秀梅[4],王健春[4],林树茂[1*]

(1. 佛山科学技术学院生命科学与工程学院,广东 佛山 528231; 2. 中国兽医药品监察所,北京 100081;
3. 广东奔源科技发展有限公司,广州 510650; 4. 天津市动物疫病预防控制中心,天津 300402)

[收稿日期] 2019 - 10 - 10　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 - 1280 (2020) 01 - 0053 - 06　[中图分类号] S859.79

[摘　要]　为了检测不同中草药提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的抑菌效果,选取了 7 种不同粉碎粒度的中草药进行试验。用水提取法制备提取液,通过微量肉汤稀释法测定各提取液的抑菌效果。结果表明,厚朴、白术、茵陈提取液对金黄色葡萄球菌具有较强的抑菌活性;细粒度的厚朴提取液对 MRSA 的抑菌效果比粗粒度的厚朴提取液好。由此可见,厚朴提取物对 MRSA 具有潜在的抗菌优势。

[关键词]　中草药;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA);粉碎粒度;抑菌效果

Comparison of Antibacterial Effects of Different Chinese Herbal Extracts on Drug - resistant *Staphylococcus aureus*

LIU Cheng - xin[1], CUI Ming - quan[2], YAN Ben - li[3], ZHANG Hui - hua[1], WANG He - jia[2],
ZHU Xin - le[2], LIU Sen[1], LI Xiu - mei[4], WANG Jian - chun[4], LIN Shu - mao[1*]

(1. *College of Life Science and Engineering*, *Foshan University*, *Foshan*, *Guangdong* 528231, *China*;
2. *China Institute of Veterinary Drug Control*, *Beijing* 100081, *China*;
3. *Guangdong Benyuan Technology Development Co.*, *Ltd.*, *Guangzhou* 510650, *China*;
4. *Tianjin Animal Preventive and Control Center*, *Tianjin* 300402, *China*)

Corresponding author: *LIN Shu - mao*, *E - mail*: *shumao9999@163.com*

Abstract: In order to test the antibacterial effect of different Chinese herbal extracts on *Methicillin - resistant Staphylococcus aureus*(MRSA), seven Chinese herbal medicines with different particle sizes were selected for the test. The extracts were prepared by water extraction method, and the bacteriostatic effects of the extracts were

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1200100);广东省教育厅高校科研项目(2017GCZX006);国家重点研发计划项目课题(2018YFD0500305)

作者简介: 刘承鑫,硕士研究生,从事畜牧养殖方向研究。

通讯作者: 林树茂。E - mail:shumao9999@163.com

determined by micro – broth dilution method. The results showed that the extracts of *Magnolia officinalis*, *Atractylodes macrocephala* and *Capillary artemisia* had strong antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, and the antimicrobial effect of fine – grained *Magnolia officinalis* extracts on MRSA was better than that of coarse – grained *Magnolia officinalis* extracts. Therefore, *Magnolia officinalis* extract is a potential antibacterial agent for MRSA.

Key words: Chinese herbal; *Methicillin – resistant Staphylococcus aureus*(MRSA); pulverized particle size; bacteriostatic effect

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种最为常见的人畜共患致病菌,能够引起化脓性疾病或者毒素性疾病,若治疗不及时容易导致人和动物的死亡[1]。在畜牧养殖过程中不规范的使用抗生素,使金黄色葡萄球菌耐药性越来越强,耐药基因的携带比例越来越多,其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin – resistant Staphylococcus aureus*, *MRSA*)是一种对人类乃至动物感染性疾病治疗具有潜在威胁的耐药病原菌,在我国流行范围广泛,携带率高于亚洲其他国家[2]。金黄色葡萄球菌在肉制品和奶制品中最为常见,容冬丽等[3]检测了我国 15 个代表城市的部分即食食品和蔬菜样品,其中发现 9.3 % 的监测样品中检出金黄色葡萄球菌,其中卤肉的污染率最高,为 16.3 %,其次是烤肉,蔬菜的污染率最低。金黄色葡萄球菌感染,除了食物源感染以外,人体自身携带也是常见的一个感染途径,Moustafa El – Shenawy 等[4]发现 38 % 的人的皮肤都携带金黄色葡萄球菌,而携带者中有 37 % 的金黄色葡萄球菌肠毒素基因阳性,王登峰[5]发现,采集牛的临床和隐形乳腺炎奶样中金黄色葡萄球菌的分离率大多在 30 ~ 50 %,而随机采集的泌乳牛乳头混合奶样中金黄色葡萄球菌的分离率在 30% 左右。这也意味着金黄色葡萄球菌感染均威胁着人和动物的健康。

我国使用中草药具有悠久的历史,在人医方面,中医占据了世界医学的重要地位;在畜禽生产上,中草药所具有的营养作用、治疗作用、保健作用等促进着畜禽行业的不断进步。在畜禽生产上有提高生产性能,提高动物抗氧化能力等,近年不断有研究已经证实,中草药同样具有良好的抑菌效果,成为有希望替代抗生素的抑菌剂[6]。为了有效治疗金黄色葡萄球菌所引起的感染、能更好的应对细菌对抗生素耐药性、治疗过程中药物的高剂量使用等突出问题,本实验选择 7 种不同粉碎粒度的中草药提取物,检测了对金黄色葡萄球菌的抑菌活性,并选择其中抑菌效果最好的中草药对 MRSA 进行抑菌实验,为金黄色葡萄球菌中草药抑菌剂的筛选研究和中草药不同粉碎粒度对抑菌效果研究提供理论基础。

1 材 料

菌株与试剂:金黄色葡萄球菌 ATCC25923 由中国兽医药品监察所提供,金黄色葡萄球菌临床菌株(11 株)分别在不同地区(广东省 3 株、山东省 3 株、青海省 1 株、浙江省 1 株、湖南省 1 株、四川省 1 株、上海市 1 株)动物中采集;其中 1 株来源于鸡粪,2 株来源于猪粪,其余来源于牛奶。不同粉碎粒度(粗粒度组为 100 目左右,细粒度组为 1000 目左右)的厚朴、木香、藿香、茵陈、川穹、白术、杜仲由广东奔源科技发展有限公司提供;细菌 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒、引物、DNA 分子量 Marker 均购自天根生化科技(北京)有限公司;青霉素、阿莫西林、头孢西丁、苯唑西林、头孢噻呋购自英国 OXOID 公司。

2 方 法

2.1 细菌的培养与稀释 将金黄色葡萄球菌接种普通琼脂培养基,35 ℃孵育 24 h,挑取 2 ~ 4 个特征菌落用无菌生理盐水校正至 0.5 麦氏比浊单位,使其含菌量为 $1 \sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL 左右,用 MH 肉汤稀释成 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ CFU/mL,作为工作浓度。

2.2 中草药提取液的制备 准确称取样品 5 g,加

入 40 mL 蒸馏水混匀,90 ℃水浴 1 h 后,先用 4 层纱布初步过滤,收集滤液后用 0.22 μm 的滤膜再一次过滤,收集滤液,浓缩至生药浓度为 0.5 g/mL 的提取液。所得提取液放入 4 ℃冰箱备用。

2.3　药物抑菌浓度的测定　参考美国临床实验室标准委员会 CLSI[7] 所公布的标准,用微量肉汤稀释法进行测定。在 96 孔板中每排 1 ~ 12 孔无菌加入 MH 肉汤 100 μL,然后每排第 1 孔中加入药液 100 μL,吹打均匀后吸取 100 μL 转移至第 2 孔,以此类推进行倍比稀释至第 10 孔混匀后弃掉 100 μL,1 ~ 11 孔中每孔加入菌悬液 100 μL,第 11 孔为阳性对照,第 12 孔加入 100 μL 药液作阴性对照。将培养板置于 35 ℃恒温箱中培养 18 h,取出判定结果,没有细菌生长的最后一孔的药物浓度为该中草药提取物的最小抑菌浓度(MIC 值)。

2.4　临床 MRSA 的判断

2.4.1　耐药表型的鉴定:　按照 2.3 方法进行测定,参考 CLSI[7] 的判断标准,应对苯唑西林耐药。

2.4.2　*MecA* 基因检测:　按细菌 DNA 提取试剂盒的步骤提取出 DNA 后,加入 PCR 反应体系,总体积为 20 μL,PCR 条件为:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环后 72 ℃延伸 5 min,扩增产物用 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳分离。参照文献[1] 的方法,以 DNA 为模板,根据 Louie[8] 等报道分别扩增葡萄球菌属 16*s rRNA* 基因、*nuc* 基因以及 *MecA* 基因来鉴定 MRSA,引物详见表 1。

表 1　MRSA 的 *MecA* 基因的检测引物信息

Tab 1　Detection primer information of MecA gene in MRSA

引物名称	引物核苷酸序列 5'-3'	预期扩增片段长度(bp)
16*S*-*F*	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	798
16*S*-*R*	GGACTACCAGGGTATCTAAT	
MecA-1	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533
MecA-2	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	
nuc-1	GCGATTGATGGTGATACGGTT	270
nuc-2	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	

2.5　中草药对金黄色葡萄球菌及其 MRSA 的抑菌效果测定　按照 2.3 方法进行。

3　结果与分析

3.1　金黄色葡萄球菌耐药性测定结果　11 株金黄色葡萄球菌对常见抗生素的耐药情况见表 2。采用 CLSI[7] 判断标准,11 个菌株均对青霉素耐药,9 株对苯唑西林耐药,10 株对头孢西丁耐药,7 株对阿莫西林耐药,6 株对头孢噻呋耐药,同时耐这 5 种药的有 5 株。根据 2.4.1 耐苯唑西林菌株即为 MRSA。同时 ATCC25923 对 5 种抗生素的耐药情况均在其质控范围内。

表 2　11 株金黄色葡萄球菌对常见 β-内酰胺类抗生素耐药情况

Tab 2　Resistance of 11 strains of Staphylococcus aureus to common β-lactam antibiotics

抗生素名称	菌株编号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
苯唑西林	4—R	4—R	4—R	>4—R	>4—R	>4—R	4—R	4—R	2—M	1—S	4—R
青霉素	16—R	16—R	16—R	64—R	64—R	256—R	64—R	32—R	16—R	16—R	32—R
阿莫西林	4—S	4—S	4—S	16—R	16—R	16—R	16—R	8—R	8—R	1—S	8—R
头孢西丁	16—R	16—R	16—R	8—R	32—R	16—R	16—R	16—R	8—R	16—R	4—S
头孢噻呋	4—M	4—M	4—M	16—R	64—R	32—R	32—R	16—R	4—M	2—S	8—R

注:S:敏感;M:中介;R:耐药

3.2　*MecA* 基因的鉴定结果　通过提取金黄色葡萄球菌临床菌株的基因组,多重 PCR 的鉴定,结果 11 株金黄色葡萄球菌均携带 *MecA* 基因,详见图 1。

3.3　不同粒度中草药提取液对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 质控菌株的抑菌效果　各中草药提取液对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC 测定结果

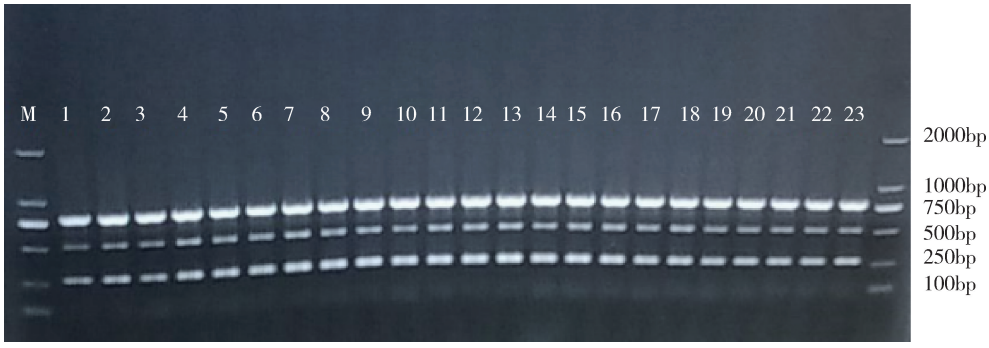

图 1　MRSA 的 16*s*、*MecA*、*nuc* 基因的检测结果

Fig 1　Detection results of 16S, MecA and Nuc genes in MRSA

如表 3 所示。结果显示,粗粒度中草药提取液中厚朴为 12.5 mg/mL,木香、茵陈、白术、杜仲都为 25 mg/mL,藿香 50 mg/mL。而该菌株对 7 种细粒度中草药提取液的敏感程度为厚朴与木香都为 12.5 mg/mL,茵陈、川穹、白术都为 25 mg/mL,藿香为 50 mg/mL。其中厚朴的抑菌效果最好。

3.4　不同粒度厚朴提取液对 11 株耐常见 β－内酰胺类耐药的金黄色葡萄球菌的抑菌效果　选择对 ATCC25923 抑菌效果最好的厚朴,检测对上述 11 株耐常见 β－内酰胺类耐药的金黄色葡萄球菌的 MIC 值。结果见表 4。细粒度厚朴除了对 5 和 8 号菌的 MIC 为 50 和 12.5 mg/mL 以外,对其他耐药菌株的 MIC 都为 3.125 mg/mL,而粗粒度厚朴 MIC 比厚朴细粒度普遍偏大,在 6.25－25 mg/mL。

表 3　不同粒度的中草药提取液对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的抑菌效果　(单位:mg/mL)

Tab 3　Bacteriostatic effect of Chinese herbal extracts with different granularity on Staphylococcus aureus ATCC25923

中草药名称	粗粒度	细粒度
厚朴	12.5	12.5
木香	25	12.5
藿香	50	50
茵陈	25	25
川穹	—	25
白术	25	25
杜仲	25	—

注:“－”表示无抑菌效果

表 4　不同粒度下的厚朴提取液对 11 株耐常见 β－内酰胺类金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Tab 4　Antibacterial effect of Magnolia officinalis extract with different granularity on 11 strains of Staphylococcus aureus resistant to common β－lactam

粉碎粒度	菌株编号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
细	3.125	3.125	3.125	3.125	50	3.125	3.125	12.5	3.125	3.125	3.125
粗	6.25	12.5	12.5	25	25	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25	6.25

4　讨　论

4.1　细菌在抗菌药的压力下获得耐药基因而产生耐药性　耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的 DNA 中产生编码青霉素结合蛋白(*PBP*2*a*)的 *MecA* 基因,*PBP*2*a* 能替代结合失活的 *PBPs* 发挥转肽酶的功能,促进细胞壁合成,从而产生耐药性[9－10]。在本试验中所有的被检菌株均含有 *MecA* 基因,其中 2 株菌株(9 和 10 号菌)对苯唑西林敏感和中敏。原因可能为表达 *MecA* 基因的辅助因子 *fem* 出现失活,导致对苯唑西林不耐药[11]。试验同时发现含有 *MecA* 基因的菌株不仅对苯唑西林有一定的耐药性,对其他 β－内酰胺类抗生素也有不同程度

的耐药,有可能是 *MecA* 基因的 DNA 片段中的 *SCCmec*能获取其他的耐药基因,导致金黄色葡萄球菌对多种 β - 内酰胺类抗生素耐药[12]。金黄色葡萄球菌多出现于乳制品,主要原因在于金黄色葡萄球菌易感染奶牛的乳房,导致乳制品中含有金黄色葡萄球菌。在本试验中的 11 株 MRSA 中大部分也从牛奶中分离,但仍有部分在鸡粪与猪粪中分离,这说明金黄色葡萄球菌可以通过其他畜禽携带传播来诱导易感动物感染。万古霉素是目前治疗 MRSA 最重要的药物,但是日本和美国都已经发现了对万古霉素不敏感的 MRSA,且有研究发现,带有抗万古霉素的质粒在一定条件下可以转入 MRSA,可以预测到,这种转染也可能在动物的机体内实现,这也意味着寻找新的抗 MRSA 的抗菌药是必要的[13]。

4.2　中草药在我国医学历史中占据重要的地位

长期以来学者们积累了大量有关中草药使用方式、使用剂量、配伍禁忌等经验,广泛的应用在各个领域。随着对中草药研究的不断深入,越来越多的中草药及其活性成分被发掘利用。本研究通过提取厚朴、木香、藿香、茵陈、川穹、白术、杜仲 7 种中草药各两种不同粒度的水溶性成分,对金黄色葡萄球菌的抑菌活性进行了研究;选用效果最好的厚朴,观察对 MRSA 的抑菌效果。试验结果表明,不同粒度的中草药下的提取液效果不尽相同,其中厚朴的综合效果最好,木香、茵陈、白术效果次之。细粒度的厚朴提取液的效果要比粗粒度的厚朴提取液要好,这与李荣誉[14]等、王洪凤[15]等的研究结果类似,其原因可能在于超微粉碎破坏中草药细胞的细胞壁,使其有效成分更好的释放,因此能减小药材的粒径,且分布逐渐均匀, 粒径较小细颗粒比例显著上升。同时,也使得药材的主要营养成分或活性成分含量有所提高,因此能够降低对 MRSA 的 MIC,提高抑菌效果。超微粉碎技术能很好的解决中药不能直接服用的问题,能提高药物的吸收率,增强药效,降低生产成本。但每种中草药自身特性是不一样的,有些中草药不适合超微粉碎技术,需要通过加强基础研究、根据药材特性和临床情况来确定不同中草药的最适粒度[16-17]。该实验对今后研究更多的不同粒度、种类或者不同的配伍的中草药的抑菌效果,开发中草药抗菌剂提供参考。

参考文献:

[1] 韩文瑜,冯书章. 现代分子病原细菌学[M]. 长春:吉林人民出版社,2003,340 - 341.
Han W Y, Feng S Z. Modern molecular pathogen bacteriology [M]. Changchun: Jilin people's Press,2003,340 - 341.

[2] 李 君. 猪源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌流行病学特征及遗传进化分析[D]. 中国农业大学,2017.
Li J. Epidemiological characteristics and phylogenetic analysis of pig associated Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* [D]. China Agricultural University,2017.

[3] 容冬丽,吴清平,吴 诗,等. 我国部分地区即食食品和蔬菜中金黄色葡萄球菌污染分布及耐药和基因分型情况[J]. 微生物学报,2018,58(02):314 - 323.
Rong D L, Wu Q P, Wu S, *et al*. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* from retail ready - to - eat foods and vegetables in some regions of China [J]. Acta microbiologica Sinica, 2018, 58 (02): 314 - 323.

[4] Moustafa E, Mohamed T, Lobnael H, *et al*. Cross sectional study of skin carriage and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* among food handlers [J]. Journal of Medical Microbiology, 2014 (4):16 - 22.

[5] 王登峰. 奶牛乳腺炎性金黄色葡萄球菌耐药基因检测、分子分型和耐甲氧西林菌株全基因组测序[D]. 中国农业大学,2016
Wang D F. Resistance genes, molecular typing and whole genome sequencing of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis [D]. China Agricultural University,2016

[6] 华德兴,钱元恕,彭 青. 绿茶对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌作用及机制研究进展[J]. 中国新药与临床杂志,2008,27(9):697.
Hua D X, Qian Y S, Peng Q. Progress of green tea antibacterial activity and mechanism against methicillin - resistant *staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies,2008,27(9):697.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Seventeenth informational supplement. M100 - S17. CLSI,2007,Wayne,PA.

[8] Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, *et al*. Rapid detection of methi-

cillin – resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40:2786 –2790

[9] 王唯霖. 中草药提取物的抑菌机理及对大肠杆菌的耐药性研究[D]. 河北农业大学, 2015

Wang W L. Study on the antibacterial mechanism of herbal extracts and drug resistance of *E. coil* [D]. Hebei Agriculture University, 2015

[10] Lee J H. Occurrence of methicillin – resistant *staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, $mecR_1$ and *mec I* genes [J]. Vet Microbiol, 2006, 114 (1 –2): 155.

[11] 朱以军,李向阳. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药机制及检测[J]. 国外医学. 临床生物化学与检验学分册, 2005 (01):26 –28 +31.

Zhu Y J, Li X Y. Drug resistance mechanism and detection of *methicillin – resistant Staphylococcus aureus* [J]. Foreign Medical Sciences, 2005(01):26 –28 +31.

[12] Enright M C, Robinson D A, Randle G, *et al*. The evolution – ary history of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (11): 7687 –7692.

[13] 杨清宇. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004(04):122 –124.

Yang Q Y. Study on methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Nosoconmiology, 2004(04):122 –124.

[14] 李荣誉,张国祖,王海蓝,等. 超微粉碎对黄连解毒散和白头翁散体外抑菌效果的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2011, 30 (05):17 –19.

Li R Y, Zhang G Z, Wang H L, *et al*. Effect of ultramicro – pulverization on the antimicrobial activity in vitro of Huanglianjiedu powder and Baitouweng powder [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2011, 30(05):17 –19.

[15] 王洪凤,印 酬,向红霞,等. 超微粉碎对银翘散急性毒性和主要药效学的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(07):714 –718.

Wang H F, Yin F, Xiang H X, *et al*. Effect of ultrafine process on the acute toxicity and major pharmacodynamics of Yinqiao San [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2018, 38(07):714 –718.

[16] 邢晓玲. 浅析超微粉碎技术及其在中药制药中的应用优势[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(01):179 +181.

Xing X L. Study on ultra – fine grinding technology and its advantages in the application of traditional Chinese medicine [J]. World Latest Medicine Information, 2019, 19(01):179 +181.

[17] 舒朝晖,刘根凡,马孟骅,等. 中药超微粉碎之浅析[J]. 中国中药杂志, 2004(09):6 –10.

Shu Z H, Liu G F, Ma M H, *et al*. Study on the superfine comminution of traditional Chinese medicine [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2004(09):6 –10.

(编 辑:陈 希)