

本文引用:李玲,卢芳国,陈伶俐,向琴,高强,魏科,胡珏,宁毅.小檗碱体外抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性的研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):254-256.

小檗碱体外抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性的研究

李玲,卢芳国,陈伶俐,向琴,高强,魏科,胡珏,宁毅*
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 研究小檗碱体外抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)活性。**方法** 运用琼脂扩散法、液体稀释法测定并分析小檗碱对 MRSA 的抑菌环大小、最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC);运用 96 孔酶标板结晶紫法测定并分析小檗碱对 MRSA 的最小生物膜清除浓度(MBEC)。**结果** 与 DMSO 比较,小檗碱与氯霉素(阳性对照药物)可显著增加 MRSA 的抑菌环半径($P<0.01$),小檗碱对 MRSA 的 MIC 为 0.2 mg/mL, MBC 为 0.4 mg/mL;小檗碱对 MRSA 的 MBEC 为 0.2 mg/mL。**结论** 小檗碱对 MRSA 有比较明显的抗菌、抑菌作用,其效应机制可能与其抑制细菌生物膜的形成有关。

[关键词] 小檗碱;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;生物膜

[中图分类号]R285 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.03.006

Effect of Berberine on the Activity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Vitro

LI Ling, LU Fangguo, CHEN Lingli, XIANG Qin, GAO Qiang, WEI Ke, HU Jue, NING Yi*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study berberine on the activity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. **Methods** The size of antibacterial annulus, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of MRSA intervened by berberine were measured by Agar diffusion test and broth dilution test. The crystal violet staining method measured on 96 well Elisa-plate was applied to analyze minimal biofilm eradication concentration (MBEC). **Results** Compare with DMSO, berberine and chloramphenicol (positive control drug) could significantly increase the antibacterial annulus radius of MRSA ($P<0.01$). The MIC, MBC and MBEC of berberine against MRSA were 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL and 0.2 mg/mL, respectively. **Conclusion** Berberine shows obvious inhibition effect on MRSA, and its mechanism may be related to the inhibition of bacterial biofilm formation.

[Keywords] berberine; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; biofilm

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)是临床上常见的毒力较强的细菌,是导致坏死性肺炎、坏死性筋膜炎、败血症等感染性疾病的重要病原体^[1]。近年来该菌的感染日益增多,严重威胁人类健康。万古霉素是目前临床上确认的治疗 MRSA 感染的有效药物,但由于万古霉素的滥用,万古霉素对 MRSA 的最低

抑菌浓度 (MIC) 提高,导致万古霉素疗效欠佳^[2]。MRSA 一旦发展为对万古霉素普遍耐药,其感染患者将面临无药可治的危险境地。因此,研发与筛选抗 MRSA 的新型药物刻不容缓。天然植物特别是中草药中蕴含着丰富的天然活性物质,从中筛选抗 MRSA 药物有良好的应用前景。笔者研究了小檗碱对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性影响,本文报道

[收稿日期]2017-12-04

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81473468,81503445,81774126,81703919);湖南省教育厅创新平台开放基金项目(17K067);湖南省自然科学基金(2016JJ2095,2016JJ3098);湖南省教育厅优秀青年基金(15B169);湖南省高校科技创新团队《感染性疾病中医药防治研究》资助项目(15);湖南省省级精品课程《免疫学基础与病原生物学》资助项目(48);湖南中医药大学重点学科《基础医学》、《病原生物学》资助项目(1)。

[作者简介]李玲,女,实验师,硕士,研究方向:中医药防治感染性疾病的研究。

[通讯作者]*宁毅,男,讲师,博士,E-mail:121407735@qq.com。

如下。

1 实验材料

1.1 药物与制剂

小檗碱:购自上海源叶生物科技有限公司,规格:20 mg,CAS号:2086-83-1,批号: B21379。实验时用 DMSO 配制的 16 mg/mL 小檗碱母液,涡旋仪上振荡直至粉末溶解,用无菌液体培养基稀释小檗碱母液 10 倍至 1.6 mg/mL,即含 DMSO 浓度为 10%。

1.2 菌种及培养基

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)为湖南中医药大学第一附属医院检验科分离与鉴定的临床耐药株,湖南中医药大学病原免疫实验室保存。菌种经活化、鉴定后取对数生长期菌液进行实验。实验用的菌液浓度为 1.5×10^8 cfu/mL。菌种的活化与培养用肉汤培养基及普琼脂培养基培养。

2 方法

2.1 抗菌活性的测定

2.1.1 抑菌环大小的测定 运用琼脂扩散法测定,具体操作如下:取直径 12 cm 平皿,倾入培养基 10 mL,冷凝后用灭菌的棉拭子蘸取供试菌液均匀涂布在培养基表面,室温干放置 2~3 min。将直径 6 mm 的无菌牛津杯置琼脂平皿上,于杯中加浓度为 1.6 mg/mL 的小檗碱 50 μ L(即 80 μ g/杯),每种药液设 3 个重复对照。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后取出,测抑菌环直径,并求出每种药液 3 个孔抑菌环半径的平均值。同步设阳性药物对照和阴性药物。阳性药物为氯霉素:30 μ g/片(药敏纸片法),阴性药物为 10% DMSO,加 50 μ L/孔。

2.1.2 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定^[3] 运用液体稀释法测定,具体操作如下:在 96 孔细胞培养板中,用液体培养基等倍稀释小檗碱药液(浓度为 0.8 mg/mL~0.0125 mg/mL),每孔加稀释小檗碱药液 100 μ L,每孔加 10 μ L 供试菌液,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,以 MTT 法检测各孔 600 nm 波长下吸光度值。同步设培养基对照孔、菌液对照孔、药液对照孔。在培养基对照孔无菌生长和菌液对照孔有菌生长的情况下,分析判断实验孔结果。以完全无细菌生长(OD 值=0)的最低浓度作为药物对该菌的最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration,MBC),以 OD 值突然升高前的临界值为药物最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC)。考虑到药物本身有颜色,实验结果的 OD 值为去掉

药物本底 OD 值后的余值。

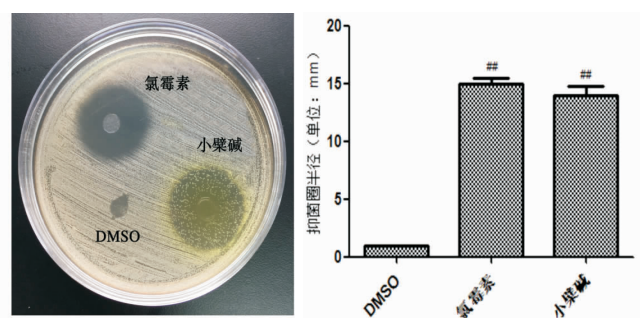
2.2 最小生物膜清除浓度(MBEC)的测定^[4]

运用 96 孔酶标板结晶紫法测定,具体操作如下:在 96 孔细胞培养板中,用液体培养基等倍稀释小檗碱药液(稀释浓度为 0.8 mg/mL~0.025 mg/mL),每孔先加稀释小檗碱药液 100 μ L,再加 10 μ L 供试菌液,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,去掉孔内菌液,用生理盐水洗 3 次培养板,并于每孔加入 1% 的结晶紫 100 μ L,室温孵育 1 min,再加入 30% 的乙酸脱色 5 min,于 595 nm 波长下测吸光度值。同步设培养基对照孔、菌液对照孔。在培养基对照孔无生物膜形成和菌液对照孔有生物膜形成的情况下,分析判断实验孔结果。以 OD 值突然升高前的临界值为药物最小生物膜清除浓度(minimum biofilm eradication concentration,MBEC)。

3 结果

3.1 抗菌活性的测定结果

如图 1、图 2 所示:与 DMSO 比较,小檗碱与氯霉素(阳性对照药物)可显著增加 MRSA 的抑菌环半径($P < 0.01$)。小檗碱对 MRSA 的 MIC 为 0.2 mg/mL;MBC 为 0.4 mg/mL。表明小檗碱对 MRSA 有比较明显的抗菌、抑菌作用。



注:与 DMSO 比较,## $P < 0.01$ 。

图 1 抑菌环半径的测定结果

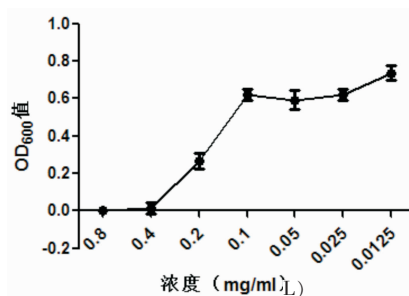


图 2 MIC、MBC 的测定结果

3.2 最小生物膜清除浓度(MBEC)的测定结果

如图 3 所示:小檗碱对 MRSA 的 MBEC 为 0.2 mg/

mL,表明小檗碱对 MRSA 生物膜的形成有比较明显的抑制作用。

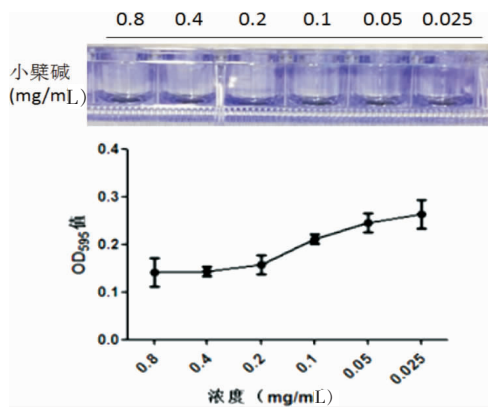


图3 MBEC的测定结果

4 讨论

小檗碱(berberine)是一种具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、降压、降糖^[5]等药理作用的异喹啉生物碱,又称黄连素,主要存在于小檗属与黄连属植物中,可从黄连、黄柏、三颗针等植物中提取。该药对多种革兰阳性菌(例如:溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎球菌等)、革兰阴性菌(例如:痢疾杆菌、伤寒杆菌,脑膜炎球菌等)、抗酸杆菌(例如:结核分枝杆菌)、真菌(例如:白假丝酵母菌)具抑菌作用,广泛用于胃肠道、细菌性痢疾等治疗,对肺结核、猩红热、急性扁桃腺炎和呼吸道感染也有一定疗效。分析已有文件报道,笔者认为小檗碱的抑菌抗炎机制可能与下列因素有关^[6-8]:(1)小檗碱能够增强白细胞及肝网状内皮系统的吞噬功能,提高机体的抗菌能力;(2)小檗碱通过 COX-1 或结合型前列腺系 E2 合成酶-1 (mPGES-1)的途径影响 PGE2 的生成,降低急性炎症组织中 PGE2 含量,提高机体抗炎作用;(3)小檗碱下调组织炎症因子 TNF- α 与 COX-2 的表达,改善组织病理变化与超微结构;(4)小檗碱抑制细菌、真菌等生物膜的形成,提高细胞膜的通透性及菌体对药物的敏感性,改善机体抗菌作用。本研究结果表明:小檗碱对 MRSA 有明显的抑菌与杀菌作用。

生物膜(biofilm)也称生物被膜,是指附着于有生命或无生命物体表面、被细菌胞外大分子包裹的有组织的细菌群体。其形成包括菌体起始粘附、生

物膜发展和成熟扩散等阶段。生物膜中存在各种生物大分子物质(例如:蛋白质、多糖、DNA、RNA、肽聚糖、磷脂等)。由于生物膜的屏障作用,生物膜内的细菌、真菌对临床常用抗生素的敏感性显著下降,生物膜内的菌体比浮游菌更加耐药。寻求抗生物膜的药物对耐药性细菌感染的防治更为重要。目前检测生物膜的常用方法主要有 96 孔酶标板结晶紫法、显微镜观察法和直接观测法三种。96 孔酶标板结晶紫法用于观察静置培养的细菌菌膜,是目前测量菌膜生成量最常用的方法。该方法的检测原理是生物膜中的多糖与结晶紫结合而着色^[9]。因此,通过测量乙酸脱色洗脱的生物膜的 OD 值来直接确定菌膜的形成量。本研究结果表明:小檗碱对 MRSA 生物膜形成有明显的抑制作用,而且小檗碱对 MRSA 的 MBEC 与 MIC 均为 0.2 mg/mL。

中药的抗菌、抑菌机制复杂,小檗碱对 MRSA 的抗菌、抑菌作用可能与其抑制细菌生物膜的形成有关,但其影响生物膜形成的机制是什么?靶点又有哪些?有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 裴双,苏建荣.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析及 mecA 和 PVL 基因检测[J].临床和实验医学杂志,2017,16(1):94-97.
- [2] 梁晶晶,吴本权,朱家馨,等.万古霉素对下呼吸道分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MIC 漂移的研究[J].中华医院感染学杂志,2011,21(23):4885-4887.
- [3] 李唐萍,边可胤,张向宇.柠檬精油对牙周致病菌抑制作用及其安全性初步研究[J].口腔医学研究,2017,33(1):99-101.
- [4] 于倩,林静,祖力卡尔江,等.伊犁黑蜂蜂胶对口腔主要致龋细菌生物膜作用的实验研究[J].华西口腔医学杂志,2015,33(4):344-346.
- [5] 胡亚耘,董慧.小檗碱对 NIT-1 细胞胰岛素分泌的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(7):730-735.
- [6] 丁晓媚,宁玉梅,王法明,等.小檗碱对小鼠外阴阴道假丝酵母菌病的作用研究[J].浙江中西医结合杂志,2016,26(2):120-123.
- [7] 张祺嘉钰,郭琦,吉延慧,等.小檗碱与苦参总碱不同配比对 DNCB 致大鼠 UC 模型的影响[J].中药药理与临床,2015,31(1):66-68.
- [8] 孔德道,徐可晴,萧锦豪,等.小檗碱与克霉唑联用对白念珠菌体外抗菌活性的研究[J].中国抗生素杂志,2015,40(5):369-371.
- [9] 李洋,徐硕超,刘广锋,等.熊果酸对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J].广东药科大学学报,2017,33(2):158-161.

(本文编辑 李杰)