

50种中药甲醇提取物对嗜水气单胞菌的体外抑菌及抗生物膜活性的评价

傅钰瑛¹, 陈小萌², Srinivasan Ramanathan², 李 珍³, 刘 柱⁴, 林向民^{2*}

1. 福建船政交通职业学院 安全与环境学院, 福建 福州 350007

2. 福建农林大学 生命科学学院 福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福建 福州 350002

3. 漳州卫生职业技术学院, 福建 漳州 363000

4. 海南大学 生命与药物学院 分子生物实验室, 海南 海口 570228

摘要: 目的 评价50种中药甲醇提取物对嗜水气单胞菌的体外抑菌效果以及抗生物膜生成活性。方法 采取甲醇浸提的方法制备中药甲醇提取物, 计算提取率; 利用多功能酶标仪检测600 nm处的吸光度(A_{600})值测定各提取物(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹)作用16 h对嗜水气单胞菌的抑菌率; 结晶紫染色法结合多功能酶标仪测定各提取物的抗生物膜活性。结果 苏木、白芍、侧柏叶等32种中药甲醇提取物对嗜水气单胞菌抑菌效果明显, 其中苏木甲醇提取物的抑菌效果最显著, 最大抑菌率达95.56%, 起效质量浓度为0.1 mg·mL⁻¹; 石菖蒲、大青叶、广藿香等20种中药甲醇提取物明显抑制嗜水气单胞菌生物被膜的生成, 其中白芍的最大抑制率达96.78%。结论 夏枯草、野菊花、大青叶、赤芍、石菖蒲、地肤子、连翘、苏木、肉桂、女贞子、白芍、甘草、肉豆蔻、鸡血藤、乌药、莪术、侧柏叶17种中药对嗜水气单胞菌同时具有抑菌和抑制生物膜生长活性。

关键词: 中药; 嗜水气单胞菌; 体外抑菌; 抗菌活性; 抗生物膜活性; 苏木; 白芍

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)01-0064-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.009

In vitro antibacterial and anti-biofilm activities of 50 kinds of traditional Chinese medicine methanol extracts against *Aeromonas hydrophila*

FU Yuying¹, CHEN Xiaomeng², Srinivasan Ramanathan², LI Zhen³, LIU Zhu⁴, LIN Xiangmin²

1. School of Safety and Environment, Fujian Chuanzheng Communications College, Fuzhou 350007, China

2. Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3. Zhangzhou Health Vocational and Technical College, Zhangzhou 363000, China

4. Laboratory of Molecular Microbiology, School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: **Objective** To evaluate the *in vitro* antibacterial and anti-biofilm activities of 50 kinds of traditional Chinese medicine (TCM) extracts against *Aeromonas hydrophila*. **Methods** The methanol extract was prepared by methanol extraction and the extraction rate was calculated. Multifunctional enzyme marker was used to detect the absorbance ($A_{600\text{ nm}}$) value at 600 nm to determine the inhibitory rate of each extract (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg·mL⁻¹) against *A. hydrophila* for 16 h. The antibiofilm activity of the extracts was determined by crystal violet staining and multifunctional enzyme marker. **Results** Totally 32 kinds of TCM methanol extracts, including *Caesalpinia sappan*, *Paeonia lactiflora* and *Platycladus orientalis* and so on, showed obvious bacteriostatic effect on *A. hydrophila*, among which *Sappan Lignum* showed the most significant bacteriostatic effect with the maximum bacteriostatic rate of 95.56% and effective concentration of 0.1 mg·mL⁻¹. The methanol extracts of 20 kinds of TCM, such as *Acorus tatarinowii*, *Isatis indigotica* and *Pogostemon cablin* and so on, inhibited the biofilm formation of *A. hydrophila*, and the maximum inhibitory rate of *Paeonia lactiflora* was 96.78%. **Conclusion** 17 TCM have both antibacterial and anti-biofilm activity, including *Prunella vulgaris*, *Chrysanthemum indicum*, *Isatis indigotica*, *Paeonia lactiflora*, *Acorus tatarinowii*, *Kochia scoparia*, *Forsythia suspensa*, *Caesalpinia sappan*, *Cinnamomum cassia*, *Ligustrum lucidum*, *Paeonia lactiflora*, *Glycyrrhiza*

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31670129); 中国博士后科学基金面上资助项目(2019M662214); 博士科研启动专项基金(20220105)

第一作者: 傅钰瑛(1989—), 讲师, 博士, 研究方向为病原微生物耐药与致病机制。E-mail: 2021003@fjpc.edu.cn

*通信作者: 林向民, 教授, 博士生导师, 研究方向为病原微生物耐药与致病机制。Tel: (0591)83789181 E-mail: xiangmin@fafu.edu.cn

uralensis, *Myristica fragrans*, *Spatholobus suberectus*, *Lindera aggregata*, *Curcuma phaeocaulis*, *Platyclusus orientalis*.

Key words: traditional Chinese medicine; *Aeromonas hydrophila*; antibacterial *in vitro*; antimicrobial activity; anti-biofilm activity; *Caesalpinia sappan*; *Paeonia lactiflora*

嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 是一种淡水、兼性厌氧、化学有机异养的革兰阴性菌^[1],广泛存在于自然界,如淡水、污水、土壤中,是气单胞菌的模式菌种,同时也是一种人-兽-鱼共患的致病菌,可以通过表达不同的毒力因子(如黏附素、细胞毒素、溶血素、脂肪酶和蛋白酶等)感染宿主,产生疾病^[2],可导致人类肠胃炎、败血症和坏死性筋膜炎等常见的疾病^[3-4]。该菌是鱼类细菌性疾病的主要致病菌之一,为了抑制其在水产养殖中的感染,主要采取抗生素疗法,例如土霉素(OTC)、磺胺二甲氧嘧啶和奥美托普林等^[5]。然而,由于抗生素的过度使用,嗜水气单胞菌的耐药菌株正在迅速增加。此外,嗜水气单胞菌形成的生物膜也限制了抗生素的抗菌效果^[6],2016年,研究人员从水产养殖池塘和沉积物中分离出的嗜水气单胞菌对哌拉西林、诺氟沙星和头孢他啶均具有抗生素耐药性^[7];嗜水气单胞菌的多重抗生素耐药指数和抗生素最低抑菌浓度均较高^[8]。

1986年起,由嗜水气单胞菌引起的食物中毒、介水传染病、感染性腹泻、继发感染、败血症等频繁发生,其致病作用已成为公共卫生关注的问题。临床上嗜水气单胞菌主要引起肠内感染和肠外感染,其主要致病物质溶血毒素和细胞毒素常引起腹泻和感染,肠内感染主要引起胃肠炎;肠外感染包括局部皮肤感染、败血症、胆囊炎、肺炎等,肺部损害可出现发热、咳嗽、咳痰、胸痛等症状,若并发败血症,则预后较严重^[9]。扈会整等^[10]从临床感染标本中分离出的50株嗜水气单胞菌,对氨苄西林全部耐

药、对氨苄西林/舒巴坦钠耐药率为94%,对三、四代头孢菌素耐药率达40%,临床治疗嗜水气单胞菌引起感染时,应慎用头孢菌素类药物,根据药敏结果和耐药表型合理选用药物。

中药是我国的国粹之一,具有毒性低、耐药性小、价格低廉、产量丰富等优点,由于现今抗生素耐药性愈发严重,因此提取中药中的活性物质作为抗生素的替代品是当前研究的热点。中药可以抑制病原菌的代谢作用^[11-12]、破坏菌体细胞膜与细胞壁^[13-14],抑制细菌DNA、RNA以及蛋白质的合成^[15]、影响细菌群体感应^[16]等。本实验通过选取50余种中草药,对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 进行体外抑菌以及抗生物膜实验,旨在筛选出对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 有抑菌以及抗生物膜活性的中药,为草药作为水产养殖中抗生素的替代及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 中药

白附子、白茅根、白前、白芍、白鲜皮、板蓝根、补骨脂、苍耳子、侧柏叶、柴胡、陈皮、赤芍、川乌、川芎、大青叶、丹参、地肤子、莪术、附子、甘草、干姜、瓜蒌、广藿香、鸡血藤、苦参、连翘、麦芽、牛蒡子、女贞子、佩兰、蒲黄、羌活、青黛、青蒿、肉豆蔻、肉桂、桑叶、桑白皮、山茱萸、石菖蒲、苏木、乌药、五味子、夏枯草、香加皮、续断、野菊花、鱼腥草、益母草、知母,共计50种,均源于漳州百草园,药材由漳州卫生职业技术学院李珍副教授鉴定。鉴定结果见表1。

表1 50种中药的植物名称、提取部位和提取率

Table 1 Plant names, extraction sites and extraction rates of 50 kinds of TCM plants

序号	中药名称	鉴定结果	提取部位	提取率/%
1	莪术	姜科植物蓬莪术 <i>Curcuma phaeocaulis</i> Val.	茎	2
2	大青叶	十字花科植物菘蓝 <i>Isatis indigotica</i> For.	叶	9
3	赤芍	毛茛科植物芍药 <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	根	23
4	广藿香	唇形科植物广藿香 <i>Pogostemon cablin</i> Benth.	地上部分	6
5	苍耳子	菊科植物苍耳 <i>Xanthium sibiricum</i> Patr.	果实	2
6	附子	毛茛科植物乌头 <i>Aconitum carmichaelii</i> Debx.	根	7
7	陈皮	芸香科植物橘 <i>Citri reticulata</i> Blanco	外皮	33
8	白前	萝藦科植物柳叶白前 <i>Cynanchum stauntonii</i> (Decne.) Schltr. ex Lévl.	茎	9
9	补骨脂	豆科植物补骨脂 <i>Psoralea corylifolia</i> L.	果实	28
10	丹参	唇形科植物丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	根茎	19
11	石菖蒲	天南星科植物石菖蒲 <i>Acorus tatarinowii</i> Schott	茎	10

续表1

序号	中药名称	鉴定结果	提取部位	提取率/%
12	川芎	伞形科植物川芎 <i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	茎	28
13	羌活	伞形科植物羌活 <i>Notopterygium incisum</i> Ting ex H. T. Chang	根茎	29
14	苦参	豆科植物苦参 <i>Sophora flavescens</i> Alt.	根	17
15	瓜蒌	葫芦科植物栝楼 <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	果实	23
16	川乌	毛茛科植物乌头 <i>Aconitum carmichaelii</i> Debx.	根	8
17	青蒿	菊科植物青蒿 <i>Artemisia annua</i> L.	地上部分	9
18	白鲜皮	芸香科植物白鲜 <i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz.	根皮	13
19	佩兰	菊科植物佩兰 <i>Eupatorium fortune</i> Turcz.	地上部分	14
20	地肤子	藜科植物地肤子 <i>Kochia scoparia</i> (L.) Schrad.	果实	16
21	柴胡	伞形科植物柴胡 <i>Bupleurum Chinense</i> DC.	根	25
22	续断	川续断科植物川续断 <i>Dipsacus asper</i> Wall. ex Henry	根	39
23	连翘	木樨科植物连翘 <i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	果实	37
24	麦芽	禾本科植物大麦 <i>Hordeum vulgare</i> L.	果芽	7
25	苏木	豆科植物苏木 <i>Caesalpinia sappan</i> L.	木质部	33
26	肉桂	樟科植物肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i> Presl	树皮	9
27	青黛	十字花科植物菘蓝 <i>Isatis indigotica</i> For.	茎叶	3
28	板蓝根	十字花科植物菘蓝 <i>Isatis indigotica</i> For.	根	10
29	女贞子	木樨科植物女贞 <i>Ligustrum lucidum</i> Ait.	果实	23
30	白芍	毛茛科植物芍药 <i>Paeonia iactiflora</i> Pall.	根	2
31	侧柏叶	柏科植物侧柏 <i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco	叶	11
32	蒲黄	香蒲科植物水烛香蒲 <i>Typha angustifolia</i> L.	花粉	19
33	白附子	天南星科植物独角莲 <i>Typhonium giganteum</i> Engl.	块茎	0.2
34	干姜	姜科植物姜 <i>Zingiber officinale</i> Rosc.	茎	6
35	甘草	豆科植物 <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	根茎	20
36	白茅根	禾本科植物白茅 <i>Imperata cylindrica</i> (L.) Beauv.	茎	10
37	肉豆蔻	肉豆蔻科植物肉豆蔻 <i>Myristica fragrans</i> Houtt.	种子内核	12
38	黄精	百合科植物黄精 <i>Polygonatum sibiricum</i> Delar. ex Redoute	茎	27
39	五味子	木兰科植物五味子 <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	果实	42
40	鸡血藤	豆科植物密花豆 <i>Spatholobus suberectus</i> Dunn.	茎	11
41	知母	百合科植物知母 <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	茎	43
42	鱼腥草	三白草科植物蕺菜 <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	地上部分	7
43	香加皮	萝藦科植物杠柳 <i>Periploca sepium</i> Bge.	根皮	14
44	夏枯草	唇形科植物夏枯草 <i>Prunella vulgaris</i> L.	穗	6
45	玄参	玄参科植物玄参 <i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl.	根	39
46	牛蒡子	菊科植物牛蒡 <i>Arctium lappa</i> L.	果实	28
47	野菊花	菊科植物野菊 <i>Chrysanthemum indicum</i> L.	花	21
48	山茱萸	山茱萸科植物山茱萸 <i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.	果肉	55
49	乌药	樟科植物乌药 <i>Lindera aggregata</i> (Sims) Kosterm.	根	6
50	桑叶	桑科植物桑叶 <i>Morus alba</i> L.	叶	7

1.2 菌株

本实验所用嗜水气单胞菌 ATCC 7966 为本实验室保存。

1.3 主要仪器

LABCOUCO-7810041 真空冷冻干燥机(照生有限公司);SPX-60BSH-II生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司);SW-CJ-1FD型单人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);ZQZY-BST全温恒温培养摇床(知楚仪器公司);SpectraMax® i3多功能

酶标仪(Molecular Devices);移液器、涡旋震荡器等。

1.4 主要试剂

甲醇购自国药集团化学试剂有限公司;其余化学试剂均为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司;LB培养基胰蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母提取物 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NaCl $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,购于广州赛国生物科技有限公司;本研究在配制培养基时,所用水为超纯水。

2 方法

2.1 中药提取液制备

每种中药磨成粉末,称取10 g后浸泡于100 mL甲醇溶液,放置于30 °C恒温摇床中200 r·min⁻¹摇72 h,滤纸滤过。滤过后使用冷冻干燥机抽干甲醇溶液,称取浓缩后的固体质量,用甲醇重新复溶成200 mg·mL⁻¹的母液。通过浓缩后固体的质量/样本总量计算提取率,结果如表1所示,其中山茱萸、知母、五味子等8种中药活性物质的提取率超过30%,以山茱萸活性物质的提取率55%为最大值;甘草、野菊花等11种中药活性物质提取率大于20%,其余中药的活性物质提取率小于20%,且白附子块茎活性物质的提取率仅有0.2%。

2.2 中药抑菌实验

首先将嗜水气单胞菌培养过夜,取在超净工作台已提前灭好菌的24孔板,每个孔加入1 mL LB培养基。按照每3个孔为1组重复,设置0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹ 6个质量浓度梯度的中药活性物质,并且加入1%过夜菌。剩下的3个孔,1个加入1%过夜菌作为对照,另外2个孔加入1.6、3.2 mg·mL⁻¹的中药活性物质作为阴性对照,同时可以排除中药颜色对吸光度(*A*)值测量的影响。

将加好样的24孔板放置于30 °C培养箱中静置培养16 h,利用多功能酶标仪SpectraMax® i3测量每个孔在600 nm处的 A_{600} 值,此外,将实验组含有1.6、3.2 mg·mL⁻¹质量浓度的中药活性物质的数值减去阴性对照的数值。数据导入统计学软件处理并进行显著性差异分析。

2.3 中药抗生物被膜实验

将上一步测完 A_{600} 的24孔板的菌液倒出,用水轻柔冲洗3次直至完全清洗干净后吹干,每个孔加入250 μL 0.1%结晶紫溶液,置于室温染色20 min后弃去,用双蒸水轻柔冲洗后吹干;每孔加入250 μL 95%的乙醇溶液室温孵育10 min,待与生物膜结合的结晶紫完全溶解后混匀,用SpectraMax® i3多功能酶标仪检测其575 nm波长下的 A_{575} 值,数据导入统计学软件处理并进行显著性差异分析。

2.4 数据分析

利用抑菌实验、抗生物被膜实验得到的结果分别计算抑制率(实验组 A 值/对照组 A 值);采用Z-score归一化方法对获得的抑制率进行标准化处理,计算公式见公式(1),并结合TBtools v1.09876版本软件绘制热图进行可视化处理;将结果导入GraphPad Prism Version 8.0.1版本软件,通过单因素

方差分析法(one-way ANOVA)进行显著性差异分析。

$$x' = (x - \mu) / \sigma \quad (1)$$

x' 是标准化抑制率, x 是抑制率, μ 是数据集的平均值, σ 是标准差

3 结果

3.1 中药抑菌实验结果

抑菌实验结果表明,不同中药对嗜水气单胞菌的抑菌效果不同。如图1所示,当中药处理质量浓度小于0.2 mg·mL⁻¹时,有且仅有苏木表现出明显的抑菌效果;当质量浓度大于0.2 mg·mL⁻¹时,苏木、白芍、侧柏叶、肉桂、青蒿等32种中药对嗜水气单胞菌均产生抑菌效果,其中苏木的抑菌效果最为明显,抑菌率达95.56%。选取苏木、白芍、侧柏叶、干姜、肉桂、女贞子、青蒿、肉豆蔻、鸡血藤、白附子、乌药、莪术12种效果最为明显的中药抑制率绘制柱状图,如图2所示,与对照组比较,12种中药甲醇提取物

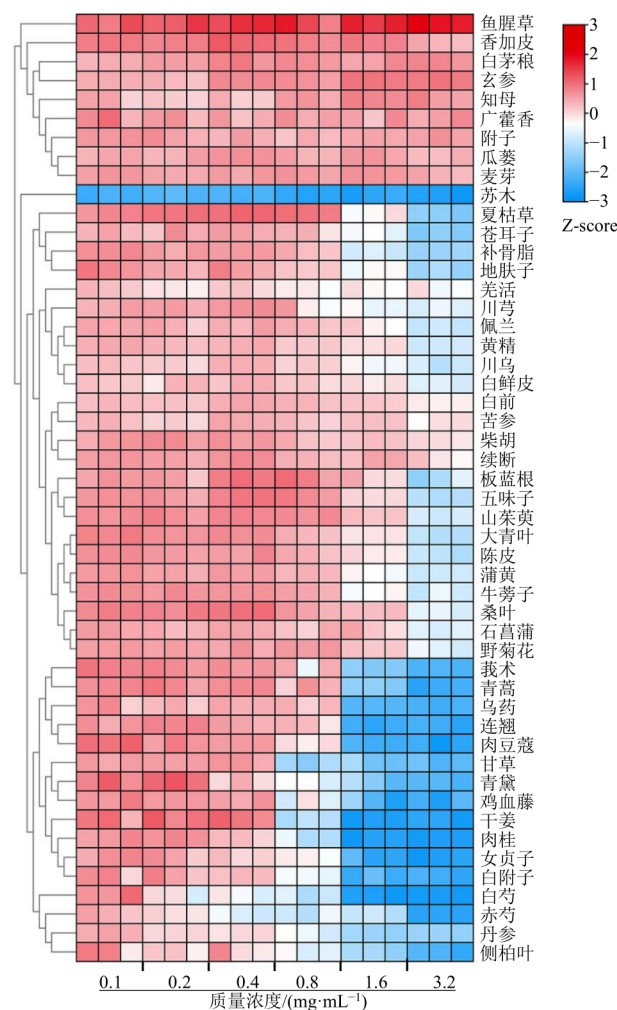
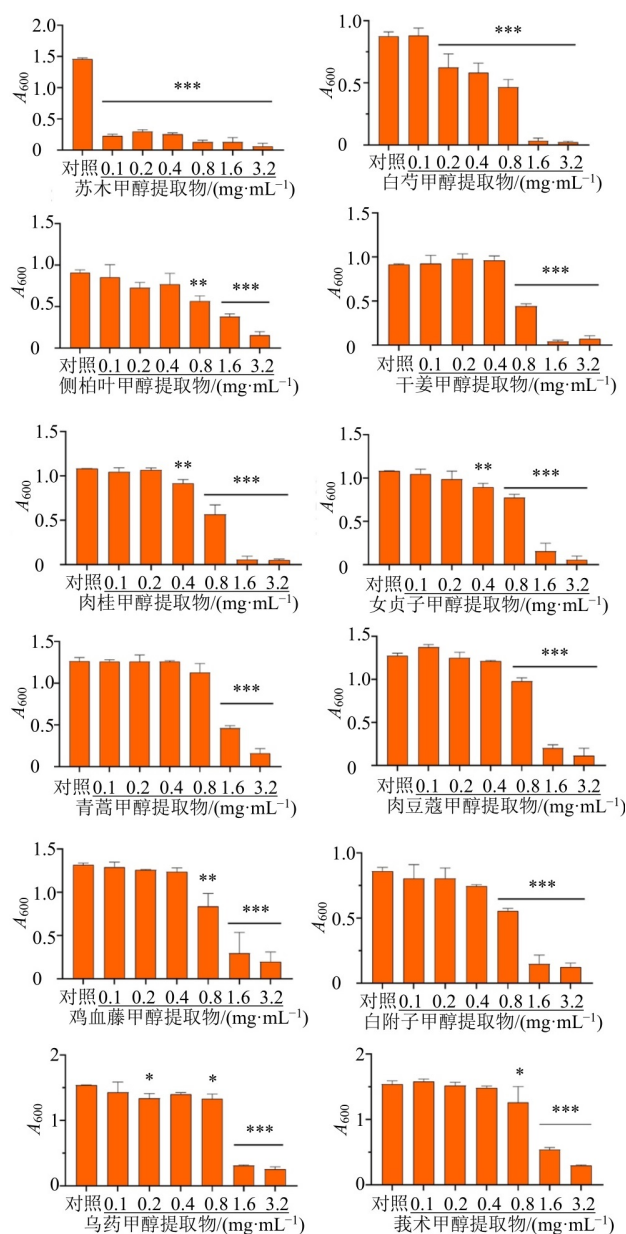


图1 50种中药甲醇提取物对嗜水气单胞菌生长的抑制率标准化结果

Fig. 1 Standardized results of inhibition rate of 50 kinds of TCM methanol extracts on *A. hydrophila* growth



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.01$ vs control group

图2 多种中药甲醇提取物对嗜水气单胞菌生物活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of methanol extracts from various TCM on biological activity of *A. hydrophila* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

量浓度为1.6、3.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 A_{600} 均显著下降($P < 0.001$),其中苏木甲醇提取物0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 即差异显著($P < 0.001$)。

3.2 中药抗生物膜实验结果

如图3所示,大青叶、苏木、肉桂、甘草、夏枯草等20种中药对嗜水气单胞菌生物被膜的生成有抑制作用,其中白芍的效果最显著,最大抑制率达96.78%。选择石菖蒲、白茅根、肉豆蔻、野菊花、桑

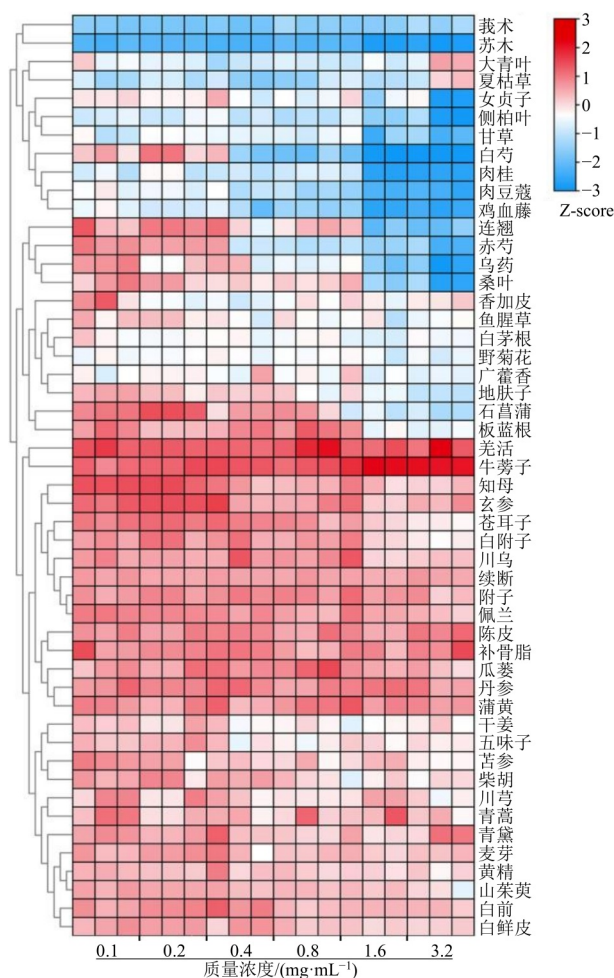


图3 50种中药甲醇提取物在不同浓度下对嗜水气单胞菌生物被膜生成能力抑制率标准化结果

Fig. 3 Standardized results of inhibition rate of 50 kinds of TCM methanol extracts on biofilm formation ability of *A. hydrophila* at different concentrations

叶这5种效果较为明显的中药,绘制出柱状图,如图4所示,与对照组比较,5种中药甲醇提取物质量浓度为1.6、3.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 A_{575} 均显著下降($P < 0.01$ 、0.001),白茅根、肉豆蔻和野菊花的抑制生物被膜生成的质量浓度低至0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

综合中药提取物对嗜水气单胞菌生长以及生物膜生成活性影响结果,发现选取的50种中药中有32种具有抑菌活性,20种具有抑制生物膜生长活性,并且其中17种同时具有抑菌和抑制生物膜生长活性,见图5。

4 讨论

有研究报道,每年由于耐药细菌感染导致全球约70万人口死亡,而预计到2050年,仅亚洲地区就将有470多万人死于耐药细菌的感染^[17]。近年来嗜水气单胞菌在临床的耐药性不断上升并呈现较严重的多重耐药,正引起国内外广泛关注和重视。因

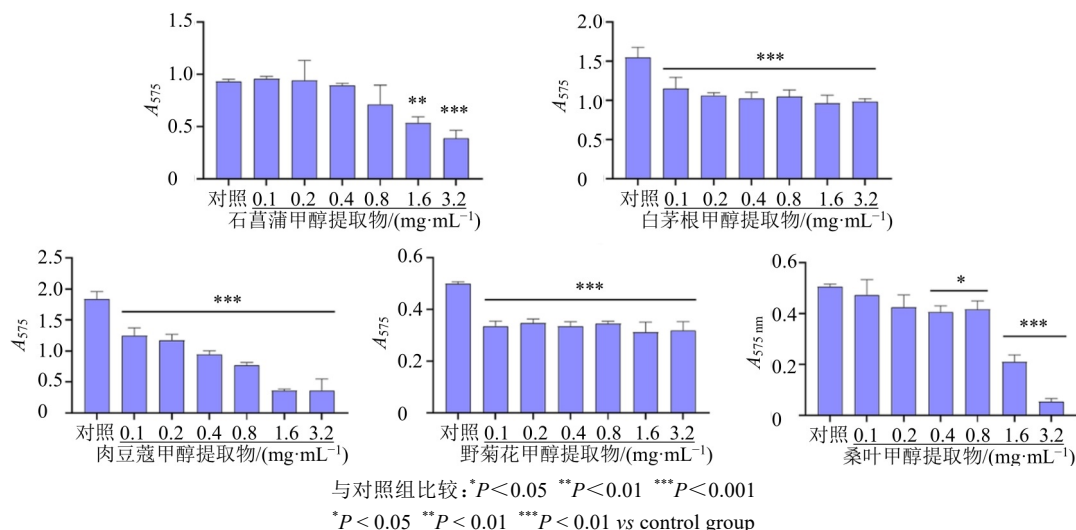


图4 多种中药甲醇提取物对嗜水气单胞菌生物膜生成活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of selected methanolic extract of various TCM plants on biofilm formation of *A. hydrophila* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

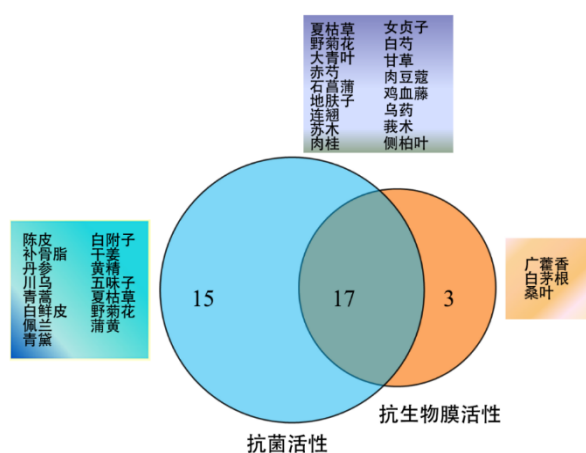


图5 中药对嗜水气单胞菌的抗菌、抗生物膜活性的韦恩图
Fig. 5 Venn diagram showed anti-bacterial and anti-bio-film activities of TCM plants against *A. hydrophila*

此迫切需要高效的、天然的、不产生耐药性的中药抑菌剂代替传统抗生素用于嗜水气单胞菌的防治。

此外,嗜水气单胞菌可导致鱼类的败血症、溃疡、脓肿、腹水、出血等状况,死亡率很高^[18],对水产行业造成巨大损失^[19]。其耐药菌株的出现给水产动物病原菌的防治带来棘手的难题,同时严重影响水产动物源食品的质量安全,进而危害人类健康。中草药因为经济、有效、不产生耐药性、可再生、环保且对农民友好等优点,受到了研究人员的广泛关注,此外,大量研究表明,草药作为水产养殖中抗生素的替代具有巨大的抗菌潜力^[20]。Yin等^[21]发现中药中的黄芪和灵芝可以有效降低嗜水气单胞菌对鲤鱼的感染,Ardó等^[22]也发现黄芪和金银花可以激活罗非鱼的非特异性免疫,降低嗜水气单胞菌对其的感染;宋春雨等^[23-24]发现从苦地中提取的胆内酯

按照0.8%、1.6%的剂量加入饲料饲养斑马鱼,能够增强其抗嗜水气单胞菌致病性胞外产物的分泌,且效果与0.1%的恩诺沙星的效果相当;牛一国等^[25]和Sheikhlar等^[26]先后提出厚朴酚、黄藤素、飞扬草甲醇提取物对嗜水气单胞菌抑菌效果良好;Dong等^[27]发现白藜芦醇可以抑制嗜水气单胞菌气溶素和生物膜的生成。这些实验均表明中药在预防嗜水气单胞菌方面前景较为广阔,且有效性较高,可以代替抗生素成为一种新型抑菌方法。

本实验选取了 50 种之前未在嗜水气单胞菌中报道过的中药提取物,进行了抑菌以及抗生物膜活性的实验,发现了苏木、白芍、侧柏叶等 32 种具有较为明显的抑菌活性的中药,其中苏木的抑菌效果最强,蒲荣等^[28]探究了苏木的甲醇、氯仿和水提取物对甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)抗菌活性,结果显示苏木醇提取物具有较好的抗 MRSA 活性;巴西苏木素抗菌活性强且无不良反应,为研发新型抗 MRSA 药物奠定了基础。同时实验发现了石菖蒲、白茅根、肉豆蔻等 20 种具有较为明显的抑生物被膜生成的中药,其中白芍的抗生物膜作用最强,杨学安等^[29]发现白芍总苷在体外具有抑制金黄色葡萄球菌生物被膜形成的作用,并能通过破坏已形成的生物被膜起到杀灭相应细菌的作用,为临床辅助治疗耐药性感染,提供实验依据。实验结果发现,莪术、大青叶、赤芍、石菖蒲、苏木、肉桂等 17 种中药同时具有抑菌活性和抑制生物膜生长活性,说明大多数中草药同时具备抑菌和抗生物膜生成的能力,但是具体的机制仍需要进一步的研究。许颖等^[30]发现苏木提取物可通过抑制粪肠球菌毒力因

子 *cylA*、*efaA*、*gelE* 的表达而实现抑菌效果,这提示苏木提取物有可能通过影响或者干扰某些毒力因子的表达,从而抑制嗜水气单胞菌的生长。此外,苏木同时具有良好的抑菌和抗生物膜生成的效果,进一步提示苏木也可能通过抑制嗜水气单胞菌生物被膜的形成,从而起到抑菌的作用。以上发现为嗜水气单胞菌中药抑制剂的研究奠定一定的理论基础。

本研究发现,莪术、大青叶、赤芍、石菖蒲、苏木、肉桂等17种中药甲醇提取物同时具有抑菌活性和抑制生物膜生长活性,其中苏木的抑菌效果最强,白芍的抗生物膜作用最强,为草药临床应用抗嗜水气单胞菌及水产养殖中替代抗生素提供参考。尽管关于药用植物在细菌性疾病感染中的应用研究越来越多,但仍需要更多的研究来确定各种药用植物对不同细菌的剂量、治疗持续时间和效果的确切模式,以便使更多的潜在植物运用于抑制病原菌的感染^[31]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fu Y Y, Zhang L S, Wang G B, et al. The LysR-type transcriptional regulator YeeY plays important roles in the regulatory of furazolidone resistance in *Aeromonas hydrophila* [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 577376.
- [2] Beaz-Hidalgo R, Figueras M J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease [J]. J Fish Dis, 2013, 36(4): 371-388.
- [3] Rasmussen-Ivey C R, Figueras M J, McGarey D, et al. Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: In the wake of reclassification [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1337.
- [4] Gołaś I, Szmyt M, Glińska-Lewczuk K. Water as a source of indoor air contamination with potentially pathogenic *Aeromonas hydrophila* in aquaculture [J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(4): 2379.
- [5] Agnew W, Barnes A C. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination [J]. Vet Microbiol, 2007, 122(1/2): 1-15.
- [6] Liu J, Gao S S, Dong Y H, et al. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila* [J]. BMC Microbiol, 2020, 20(1): 141.
- [7] Kathleen M M, Samuel L, Felecia C, et al. Antibiotic resistance of diverse bacteria from aquaculture in Borneo [J]. Int J Microbiol, 2016, 2016: 2164761.
- [8] Preena P G, Arathi D, Raj N S, et al. Diversity of antimicrobial-resistant pathogens from a freshwater ornamental fish farm [J]. Lett Appl Microbiol, 2020, 71(1): 108-116.
- [9] 王施施, 杨锦红, 刘彩霞, 等. 肠外感染嗜水气单胞菌的临床分布及耐药性分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(5): 736-737.
Wang S S, Yang J H, Liu C X, et al. Distribution and antimicrobial resistance of extraintestinal parenteral *Aeromonas hydrophila* [J]. Chin J Health Lab Technol, 2017, 27(5): 736-737.
- [10] 扈会整, 李俊海, 张晔婷, 等. 临床感染嗜水气单胞菌的产酶性和耐药性分析 [J]. 临床输血与检验, 2017, 19(5): 460-461.
Hu H Z, Li J H, Zhang Y T, et al. Analysis of enzyme production and drug resistance of *A. hydrophila* [J]. J Clin Transfus Lab Med, 2017, 19(5): 460-461.
- [11] Zhang H Y, Tian J X, Lian F M, et al. Therapeutic mechanisms of traditional Chinese medicine to improve metabolic diseases via the gut microbiota [J]. Biomedicine Pharmacother, 2021, 133: 110857.
- [12] Feng X C, Li Y, Brobbey Oppong M, et al. Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites [J]. Drug Metab Rev, 2018, 50(3): 343-356.
- [13] Su T, Qiu Y, Hua X S, et al. Novel opportunity to reverse antibiotic resistance: To explore traditional Chinese medicine with potential activity against antibiotics-resistance bacteria [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 610070.
- [14] Fu B, Wu Q L, Dang M Y, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by traditional Chinese medicinal herb *Herba patriniae* [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 9584703.
- [15] Li P C, Lam E, Roos W P, et al. Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair [J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4347-4351.
- [16] Sun T, Li X D, Hong J, et al. Inhibitory effect of two traditional Chinese medicine monomers, berberine and matrine, on the quorum sensing system of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2584.
- [17] Innes G K, Randad P R, Korinek A, et al. External societal costs of antimicrobial resistance in humans attributable to antimicrobial use in livestock [J]. Annu Rev Public Health, 2020, 41: 141-157.
- [18] Stratev D, Odeyemi O A. An overview of motile *Aeromonas* septicaemia management [J]. Aquacult Int, 2017, 25(3): 1095-1105.
- [19] Manaf S S R, Mohd D D H. Screening of phytochemical properties and antimicrobial activity of Malaysian

- medicinal plants against aquatic bacteria [J]. Malays J Microbiol, 2016: 284-290.
- [20] Syahidah A, Saad C R, Mohd Daud H, et al. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review [J]. Iran J Fish Sci, 2015, 14(1): 27-44.
- [21] Yin G J, Ardó L, Thompson K D, et al. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(1): 140-145.
- [22] Ardó L, Yin G J, Xu P, et al. Chinese herbs (*Astragalus Membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture, 2008, 275(1/2/3/4): 26-33.
- [23] 宋春雨. 苦地胆内酯对嗜水气单胞菌感染斑马鱼的保护效果及其机理初探 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012: 27-48.
- Song C Y. Protective effect and mechanism of lactones from *Elephantopus scaber* against *Aeromonas hydrophila* in zebrafish [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012: 27-48.
- [24] 宋春雨, 聂芳红, 林红英, 等. 苦地胆内酯对嗜水气单胞菌感染斑马鱼保护效果的研究 [J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(4): 84-87.
- Song C Y, Nie F H, Lin H Y, et al. Protective effect of *Elephantopus scaber* lactones on zebrafish infected by *Aeromonas hydrophila* [J]. J Guangdong Ocean Univ, 2012, 32(4): 84-87.
- [25] 牛国一, 王秋举, 李珊珊, 等. 厚朴酚和黄藤素对鱼类3种常见致病菌的抑制效应 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(3): 402-407.
- Niu G Y, Wang Q J, Li S S, et al. Antibacterial effects of magnolol and palmatine on three common pathogenic bacteria in fish [J]. J Yunnan Agric Univ Nat Sci, 2015, 30(3): 402-407.
- [26] Sheikhlal A, Meng G Y, Alimon R, et al. Dietary *Euphorbia hirta* extract improved the resistance of sharptooth catfish *Clarias gariepinus* to *Aeromonas hydrophila* [J]. J Aquat Anim Health, 2017, 29(4): 225-235.
- [27] Dong J. Resveratrol influences the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* by inhibiting production of aerolysin and biofilm [J]. Food Control, 2021, 126: 108083.
- [28] 蒲荣, 郭永灿, 区敬华, 等. 苏木对甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌抗菌活性研究及其活性成分分离 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(11): 1358-1359, 1361.
- Pu R, Guo Y C, Ou J H, et al. Study on antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* and active component against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Lab Med Clin, 2013, 10(11): 1358-1359, 1361.
- [29] 杨学安, 薛志琴, 徐琦, 等. 白芍总苷对细菌生物膜影响的研究 [J]. 中医学报, 2014(B12): 251-252.
- Yang X A, Xue Z Q, Xu Q, et al. Effect of total glucosides of paeony on the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. J Henan Univ Chin Med, 2014(B12): 251-252.
- [30] 许颖, 范淑霞, 马淑霞, 等. 苏木对粪肠球菌体外抑菌试验及其对毒力因子 *cylA*、*efaA*、*gelE* 转录表达抑制作用的初探 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(7): 615-618.
- Xu Y, Fan S X, Ma S X, et al. An *in vitro* study on the inhibitory effect of sapanwood on the transcription of virulence factors *cylA*, *efaA* and *gelE* and on the growth of *Enterococcus faecalis* [J]. Chin J Microecol, 2011, 23(7): 615-618.
- [31] Anjur N, Sabran S F, Daud H M, et al. An update on the ornamental fish industry in Malaysia: *Aeromonas hydrophila*-associated disease and its treatment control [J]. Vet World, 2021, 14(5): 1143-1152.

[责任编辑 兰新新]