

# 丁香油联用 $\beta$ -内酰胺类抗生素体外抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌作用研究

邱敏<sup>1</sup>, 龙娜娜<sup>1,2</sup>, 高鸣乡<sup>3</sup>, 周洋莹<sup>1</sup>, 孙丰慧<sup>1,2</sup>, 林琳<sup>1,2</sup>, 代敏<sup>1,2\*</sup>

1. 成都医学院检验医学院, 四川 成都 610500

2. 成都医学院 四川省动物源性食品兽药残留防控技术工程实验室, 四川 成都 610500

3. 成都医学院基础医学院, 四川 成都 610500

**摘要:**目的 探讨丁香油体外抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)活性, 以及与3种 $\beta$ -内酰胺类抗生素(阿莫西林、头孢氨苄和头孢吡肟)联合使用抗MRSA的体外活性。方法 采用96孔板微量稀释法分别测定丁香油、丁香油与3种 $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用对2株MRSA标准株和32株MRSA临床分离株的最低抑菌浓度(MIC); 微量棋盘法分别测定丁香油与3种 $\beta$ -内酰胺类抗生素的分级抑菌浓度(FIC)指数; 生长曲线法分析丁香油以及丁香油和头孢氨苄联合使用对MRSA生长的影响。结果 丁香油具有明显的体外抗MRSA活性, MIC为0.25、0.51 mg/mL。丁香油分别与3种 $\beta$ -内酰胺类抗生素(阿莫西林、头孢氨苄和头孢吡肟)联合使用时, FIC指数集中分布在 $\leq 0.5$ 和 $0.5\sim 1$ , 主要表现为协同和相加作用, 其中与阿莫西林、头孢氨苄和头孢吡肟的协同率分别为58.8%、97.0%、64.7%; 丁香油能明显增强 $\beta$ -内酰胺类抗生素抗MRSA活性, 降低 $\beta$ -内酰胺类抗生素的用量, 使其MIC<sub>50</sub>和MIC<sub>90</sub>降低为单独用药的 $1/4\sim 1/2$ 和 $1/2\sim 1$ 。生长曲线结果表明, 丁香油能明显延长MRSA延滞期, 抑制其生长速度, 生长量明显降低, 且抑制MRSA生长呈明显量效关系; 当丁香油( $1/4$  MIC)与头孢氨苄( $1/4$  MIC)联合使用后, MRSA生长几乎被抑制。结论 丁香油不仅自身具有较强的抗MRSA活性, 还具有协同增效 $\beta$ -内酰胺类抗生素抗MRSA作用, 具备治疗MRSA感染新药的开发与应用前景。

**关键词:** 丁香油; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 体外抗菌活性;  $\beta$ -内酰胺类抗生素; 协同增效

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)07-1629-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.020

## *In vitro* anti-MRSA effect of clove oil combined with $\beta$ -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

QIU Min<sup>1</sup>, LONG Na-na<sup>1,2</sup>, GAO Ming-xiang<sup>3</sup>, ZHOU Yang-ying<sup>1</sup>, SUN Feng-hui<sup>1,2</sup>, LIN Lin<sup>1,2</sup>, DAI Min<sup>1,2</sup>

1. School of Laboratory Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. Sichuan Provincial Engineering Laboratory for Prevention and Control Technology of Veterinary Drug Residue in Animal-origin Food, Chengdu 610500, China

3. School of Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the antimicrobial activities of clove oil alone and in combination with three kinds of  $\beta$ -lactam antibiotics (amoxicillin, cephalexin, and cefepime) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of clove oil alone and in combination with three kinds of  $\beta$ -lactam antibiotics against two standard MRSA and 32 MRSA isolated from clinic were determined by 96-well plate micro-dilution method. The fractional inhibitory concentrations (FICs) of clove oil and three kinds of  $\beta$ -lactam antibiotics were determined by using the micro-chessboard method. The growth curve of MRSA ATCC43300 effected by clove oil or clove oil combined with cephalexin was analyzed. **Results** Clove oil showed significant anti-MRSA activity *in vitro*, with MIC of 0.25 mg/mL and 0.51 mg/mL. The FICs were mainly distributed in the range of  $\leq 0.5$  and  $0.5$  to  $1$ , and the synergy rates were 58.8%, 97.0%, and 64.7%, when the clove oil was combined with amoxicillin, cephalexin and cefepime, respectively. Clove oil enhanced the activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against MRSA significantly, and reduced the dosage of

收稿日期: 2018-09-01

**基金项目:** 国家大学生创新创业训练项目(201613705041); 四川省科技厅应用基础(重点)项目(2016JY0014); 四川省省属高校科研创新团队建设计划(16TD0027); 教育部春晖计划(Z2016120); 成都市科技局科技惠民技术研发项目(2016-HM01-00362-SF); 成都医学院校基金(CYZ15-02); 四川省教育厅科研项目(16ZB0285); 食品生物技术重点实验室开放课题(szjj2015-011); 成都中医药大学中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地开放基金

**作者简介:** 邱敏(1995—), 女, 四川简阳人, 本科在读, 主要从事细菌耐药及抗菌药物筛选研究。E-mail: 614254095@qq.com

**\*通信作者** 代敏(1974—), 女, 四川达州人, 教授, 主要从事细菌耐药机制及感染控制研究。E-mail: daimin1015@163.com

it. The growth curve showed that the clove oil significantly inhibited the growth of MRSA, and prolonged its lag phase. And the effect showed a significant dose-effect relationship. The growth of MRSA was nearly inhibited when 1/4 MIC cefepime combined with 1/4 MIC clove oil.

**Conclusion** Clove oil not only could exhibit strong anti-MRSA activity itself, but could enhance the activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against MRSA. Hence, clove oil would be a potential new drug, which can be used as a new drug for preventing and treating MRSA infection.

**Key words:** clove oil; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; antibacterial activity *in vitro*;  $\beta$ -lactam antibiotic; synergy action

1961 年, 英国 Jeven 首次报道检出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 以来, 世界范围内有关 MRSA 引起的医院感染呈蔓延和增加趋势<sup>[1]</sup>。MRSA 是目前医院感染的重要病原菌, 其高分离率、高耐药性、高病死率对临床治疗造成了严重威胁, 死亡率高于人类免疫缺陷性疾病、病毒性肝炎、结核和流感死亡率的总和, 严重威胁着人类健康<sup>[2-4]</sup>。目前, 临床上抗 MRSA 常用药物主要有糖肽类抗生素如万古霉素, 以及恶唑烷酮类如替考拉宁和利奈唑胺<sup>[5-6]</sup>。随着临床耐万古霉素等一线药物菌株的不断增加, 抗 MRSA 感染新药研发迫在眉睫, 成为新的研究热点<sup>[7-9]</sup>。

中药作为我国的传统药, 具有广谱抗菌、调节机体免疫力等广泛药理活性, 且毒副作用小、不易产生耐药性<sup>[10-13]</sup>。丁香为桃金娘科植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb. 的干燥花蕾, 丁香的种植历史悠久, 资源丰富<sup>[14]</sup>。曾荣等<sup>[15]</sup>发现丁香精油及丁香酚具有广谱抗菌活性, 对革兰阳性和革兰阴性菌具有抑制效果, 丁香酚对革兰阳性菌效果更佳。丁香

中的主要抑菌成分是挥发油<sup>[15]</sup>, 挥发油中主要成分是丁香酚 ( $C_{10}H_{10}O_2$ , 2-甲氧基-4-烯丙基苯酚), 其结构为一个烯丙基链取代邻甲氧基苯酚<sup>[16]</sup>。前期研究发现, 丁香油具有抗菌<sup>[17]</sup>、抗氧化<sup>[18]</sup>等药理作用, 被广泛用于食品工业保鲜<sup>[19]</sup>。丁香油除上述应用外, 还具有抗炎<sup>[17,20]</sup>、镇痛<sup>[21]</sup>、清除氧自由基<sup>[22]</sup>、治疗心脑血管系统<sup>[23]</sup>和消化系统<sup>[24]</sup>等疾病的作用, 有望开发成为新的临床用药。本研究对丁香油体外抗 MRSA 活性及与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用的抗 MRSA 效果进行研究, 为丁香的综合开发与利用奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 菌株

MRSA 标准株: ATCC33591 和 ATCC43300, 购自美国典型菌种保藏中心; 32 株 MRSA 临床分离株, 来源于四川省妇幼保健院, 经 VITEK32、16 S rRNA 鉴定为金黄色葡萄球菌, 经头孢西丁抗菌药物敏感试验和 *mecA* 基因鉴定为 MRSA, 菌株来源和编号见表 1。

表 1 受试菌株的编号和来源

Table 1 Number and source of experimental bacteria

| 序号 | 菌株编号      | 菌种名称       | 来源         | 序号 | 菌株编号 | 菌种名称       | 来源       |
|----|-----------|------------|------------|----|------|------------|----------|
| 1  | ATCC43300 | MRSA 标准株   | 美国典型菌种保藏中心 | 18 | 1158 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 2  | ATCC33591 | MRSA 标准株   | 美国典型菌种保藏中心 | 19 | 1166 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 3  | 855       | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 20 | 1180 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 4  | 879       | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 21 | 1239 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 5  | 906       | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 22 | 1248 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 6  | 913       | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 23 | 1392 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 7  | 942       | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 24 | 1412 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 8  | 955       | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 25 | 4837 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 9  | 1001      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 26 | 7007 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 10 | 1013      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 27 | 7017 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 11 | 1014      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 28 | 7020 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 12 | 1031      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 29 | 7029 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 13 | 1088      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 30 | 8274 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 14 | 1102      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 31 | 8305 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 15 | 1144      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 32 | 8306 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 16 | 1155      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 33 | 8318 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |
| 17 | 1156      | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院   | 34 | 8325 | MRSA 临床分离株 | 四川省妇幼保健院 |

## 1.2 药物

丁香购自北京同仁堂股份有限公司,经成都医学院生药学李弈教授鉴定为桃金娘科植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb. 的干燥花蕾;阿莫西林(批号 B326BA3634)、头孢氨苄(批号 BA14BA0016),购自生工生物工程(上海)股份有限公司;头孢吡肟(批号 RK9Y-DN25),购自中国食品药品检定研究院。

## 1.3 试剂与仪器

M-H 肉汤培养基(Muller-Hinton Broth, MHB),购自英国 Oxoid 公司;营养琼脂,购自北京奥博星生物技术有限责任公司;麦氏比浊管,购自 Bio-Merieux SA 公司;聚山梨酯-80,购自国药集团化学试剂有限公司;0.9%氯化钠注射液,购自四川科伦药业股份有限公司;96孔板,购自加拿大 Jet Biofit 公司。

## 2 方法

### 2.1 丁香油的提取

按照《中国药典》2015年版标准,采用水蒸气蒸馏法提取丁香油,并用无水十二烷基磺酸钠进行去水处理<sup>[25]</sup>,测其密度( $\rho=652.8\text{ mg/mL}$ ),存放于棕色瓶中,4℃冰箱保存备用。

### 2.2 菌液制备

将受试菌活化后,挑单克隆于生理盐水中配成菌悬液,调整菌悬液浓度为0.5个麦氏浊度(相当于 $1.5\times 10^8\text{ CFU/mL}$ ),MHB 无菌培养基稀释100倍备用。

### 2.3 药液制备

以聚山梨酯-80为乳化剂,对丁香油进行乳化,制备成130.56 mg/mL 丁香油乳化液母液,4℃冰箱保存备用。以无菌水为溶剂,溶解抗生素,配制成质量浓度为4.096 mg/mL 的母液,4℃冰箱保存备用。采用二倍稀释法分别对丁香油乳化液和抗生素母液进行系列稀释,共稀释成12个不同质量浓度梯度的稀释液,用于测定最低抑菌浓度(MIC)和分级抑菌浓度(FIC)。

### 2.4 丁香油体外抗 MRSA 活性

**2.4.1 MIC 测定** 用96孔板微量棋盘稀释法分别测定丁香油和 $\beta$ -内酰胺类抗生素(阿莫西林、头孢氨苄、头孢吡肟)的MIC值<sup>[26]</sup>。在96孔板每孔中依次加入MHB培养液100  $\mu\text{L}$ ,稀释药液50  $\mu\text{L}$ ,受试菌液50  $\mu\text{L}$ ,使丁香油在每孔中的终质量浓度为20~32 640  $\mu\text{g/mL}$ ,抗生素的终质量浓度为1~2 048  $\mu\text{g/mL}$ ,37℃恒温培养18~24 h,观察受试菌

的生长情况。以抑制受试菌生长的最低药物质量浓度为该药对该菌的MIC值。以不加药物仅加菌液的孔为受试菌阳性对照,以不加菌液仅加药物的孔为受试菌阴性对照,以仅含培养液的孔为空白对照。每株受试菌进行3个平行实验,实验重复3次。

**2.4.2 FIC 测定** 药液稀释和菌液制备同MIC测定。根据丁香油和 $\beta$ -内酰胺类抗生素(阿莫西林、头孢氨苄和头孢吡肟)的MIC值,用微量棋盘稀释法测量丁香油与 $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用的FIC值。具体方法如下:将丁香油和抗生素倍比稀释使其终质量浓度为1/16~2 MIC,将配好的不同质量浓度的丁香油与抗生素按照棋盘法设计,两两组合加入96孔板中,每种药物加入50  $\mu\text{L}$ ,再加入100  $\mu\text{L}$ 受试菌液,37℃培养18~24 h,观察结果<sup>[27]</sup>。MIC值的判定方法同上。以不加药物仅加菌液的孔为受试菌阳性对照,以不加菌液仅加药物的孔为药物阴性对照,以仅含培养液的孔为空白对照。每株受试菌进行3个平行实验,实验重复3次。

**2.4.3 数据统计分析** 抑制50%受试菌株生长所需的最低药物质量浓度为MIC<sub>50</sub>,抑制90%受试菌株生长所需的最低药物质量浓度为MIC<sub>90</sub>。FIC指数分析<sup>[28]</sup>: $\text{FIC}=\text{甲药联用 MIC}/\text{甲药单用 MIC}+\text{乙药联用 MIC}/\text{乙药单用 MIC}$ 。结果判断<sup>[28]</sup>: $\text{FIC}\leq 0.5$ 为协同作用, $0.5<\text{FIC}\leq 1$ 为相加作用, $1<\text{FIC}\leq 2$ 为无关作用, $\text{FIC}>2$ 为拮抗作用。

### 2.5 丁香油对 MRSA 生长的影响

**2.5.1 丁香油对 MRSA 生长的影响** 采用生长曲线法分析丁香油对MRSA生长的影响。将MRSA标准株ATCC43300活化,挑单菌落于无菌生理盐水中,调菌液浓度为0.5个麦氏浊度,以1%接种量加入MHB培养液中,分为以下5组:3/4 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、1/8 MIC 丁香油[以丁香油对MRSA标准株ATCC43300的MIC(250  $\mu\text{g/mL}$ )为标准]组和对照组;37℃恒温震荡培养24 h,每2小时无菌取样,测吸光度( $A_{600}$ )值。以时间为横坐标, $A_{600}$ 值为纵坐标,绘制MRSA生长曲线。

**2.5.2 丁香油与头孢氨苄联合使用对 MRSA 生长的影响** 以头孢氨苄为代表,分析丁香油与 $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用对MRSA生长的影响。将MRSA标准株ATCC43300活化,挑取单个菌落于无菌生理盐水中,调整菌液浓度为0.5麦氏浊度,以1%的接种量加入MHB培养液中,分为丁香油(1/4 MIC, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ )组、头孢氨苄(1/4 MIC, 4  $\mu\text{g/mL}$ )组、丁

香油+头孢氨苄 (1/4 MIC 丁香油+1/4 MIC 头孢氨苄) 组、对照组共 4 个组, 37 °C 恒温震荡培养 24 h, 每 2 小时无菌取样, 测  $A_{600}$  值。以时间为横坐标,  $A_{600}$  值为纵坐标, 绘制 MRSA 生长曲线。

### 3 结果

#### 3.1 丁香油体外抗 MRSA 活性

用 96 孔板微量稀释法分别测定丁香油、阿莫西

林、头孢氨苄和头孢吡肟体外抗 MRSA 活性, 各药对 34 株供试菌的 MIC 分布范围见图 1。本研究中所使用的 MRSA 临床菌株表现为多重高水平耐药, 临床常用 3 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素 (阿莫西林、头孢氨苄和头孢吡肟) 的 MIC 值均为 4~1 024  $\mu\text{g/mL}$ 。丁香油对受试菌株具有明显体外抗 MRSA 活性, MIC 值为 250、510  $\mu\text{g/mL}$ 。

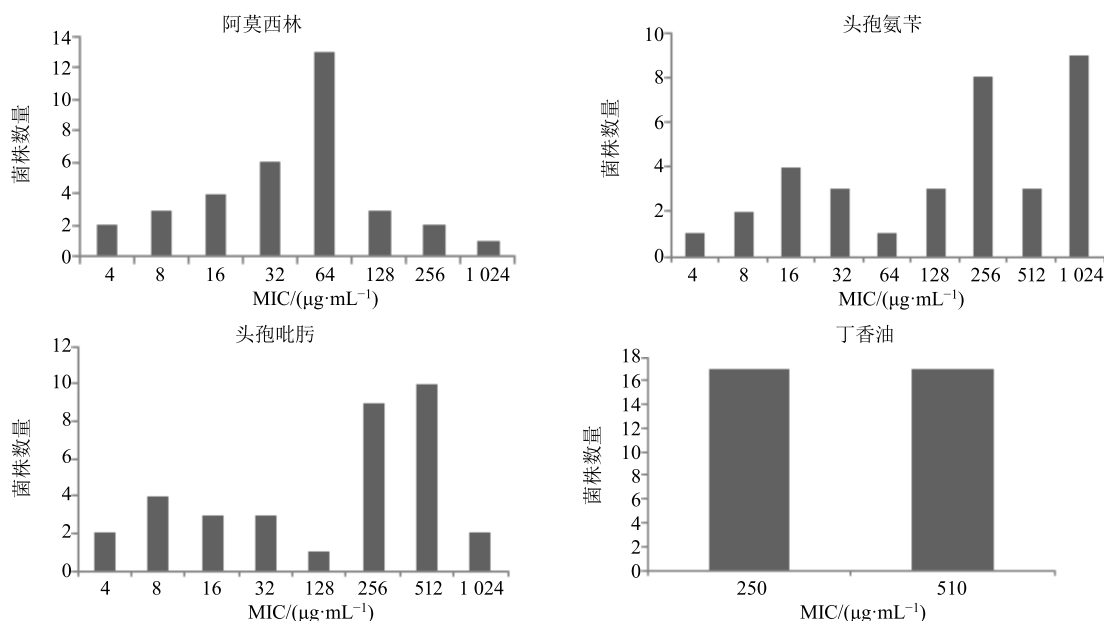


图 1 丁香油和  $\beta$ -内酰胺类抗生素的 MIC 值分布

Fig. 1 Distribution of MICs of clove oil and three kinds of  $\beta$ -lactam antibiotics

#### 3.2 丁香油与 $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用体外抗 MRSA 活性

采用微量棋盘法测定了丁香油与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用体外抗 MRSA 活性。分析了丁香油与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用对 2 株 MRSA 标准株的 MIC, 结果见表 2。由表 2 可知, 丁香油与 3 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素 (阿莫西林、头孢氨苄、头孢吡肟) 联合使用时, 能明显降低 3 种抗生素对 MRSA 的 MIC, 说明丁香油能有效增强  $\beta$ -内酰胺类抗生素的抗 MRSA 活性, 逆转 MRSA 标准株 ATCC33591 和 ATCC43300 的多重耐药活性。

由表 3 可知,  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合丁香油使用, 阿莫西林、头孢氨苄、头孢吡肟对 MRSA 临床分离株的 MIC<sub>50</sub> 和 MIC<sub>90</sub> 有不同程度的降低。其中阿莫西林的 MIC<sub>50</sub> 和 MIC<sub>90</sub> 分别降低为单独用药的 1/4 和 1/2; 头孢氨苄的 MIC<sub>50</sub> 和 MIC<sub>90</sub> 均降低为单独用药的 1/2; 头孢吡肟的 MIC<sub>50</sub> 降低为单独用药的 1/4, MIC<sub>90</sub> 无明显变化。说明丁香油可有效降低

表 2 丁香油与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用对 MRSA 的 MIC 比较分析

Table 2 MIC comparative analysis of clove oil combined with  $\beta$ -lactam antibiotics against MRSA

| 药物   | 对 ATCC33591 的<br>MIC/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |        | 对 ATCC43300 的<br>MIC/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |        |
|------|-----------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------|--------|
|      | 单用                                                        | 与丁香油联用 | 单用                                                        | 与丁香油联用 |
| 阿莫西林 | 8                                                         | 2      | 4                                                         | 4      |
| 头孢氨苄 | 16                                                        | 8      | 16                                                        | 8      |
| 头孢吡肟 | 8                                                         | 4      | 128                                                       | 8      |

表 3 丁香油与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用对 MRSA 临床分离株的 MIC<sub>50</sub> 和 MIC<sub>90</sub>

Table 3 MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of  $\beta$ -lactam antibiotics combined with clove oil against MRSA isolated from clinic

| 药物   | MIC <sub>50</sub> /( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |        | MIC <sub>90</sub> /( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |        |
|------|---------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------|--------|
|      | 单用                                                      | 与丁香油联用 | 单用                                                      | 与丁香油联用 |
| 阿莫西林 | 64                                                      | 16     | 128                                                     | 64     |
| 头孢氨苄 | 256                                                     | 128    | 1 024                                                   | 512    |
| 头孢吡肟 | 256                                                     | 64     | 512                                                     | 512    |

这 3 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素（阿莫西林、头孢氨苄、头孢吡肟）抗 MRSA 的用量。

统计分析了丁香油和  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用对 34 株 MRSA 受试菌的相互作用，结果见表 4。可知，丁香油与 3 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用，FIC 指数集中分布在  $\leq 0.5$  和  $0.5 \sim 1$ ，表明丁香油与 3 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用主要呈协同作用（58.8%~97.0%），无拮抗作用，其中与阿莫西林、头孢氨苄和头孢吡肟的协同率分别为 58.8%、97.0% 和 64.7%；其次为相加作用（3.00%~23.5%）；与头孢吡肟和阿莫西林联合使用时，极少数菌株表现为无关作用。说明丁香油可有效增强  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗 MRSA 作用，逆转 MRSA 对  $\beta$ -内酰胺类抗生

素多重耐药活性。

### 3.3 丁香油对 MRSA 生长的影响

采用生长曲线法分析了不同质量浓度丁香油对 MRSA 生长的影响，结果见图 2。可知，丁香油处理 MRSA 标准株 ATCC43300，其生长受到明显抑制，其抑制效果与质量浓度呈明显正相关，随着质量浓度增加，菌体生长速度明显降低，同时菌体生长量也随之明显下降。其中 1/8 MIC 丁香油与 1/4 MIC 丁香油对 MRSA 抑制效果不明显，1/2 MIC 丁香油较对照组延长迟缓期 2 h 进入对数期，而 3/4 MIC 丁香油能明显延长 MRSA 迟缓期，细菌延迟 16 h 进入对数期，MRSA 生长几乎被抑制。说明丁香油抑制 MRSA 生长呈明显量效关系。

表 4 丁香油与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用的 FIC 指数分析

Table 4 FIC index distribution of clove oil combined with  $\beta$ -lactam antibiotics against MRSA

| 药物       | FIC $\leq 0.5$ (协同作用) |      | 0.5 < FIC $\leq 1$ (相加作用) |      | 1 < FIC $\leq 2$ (无关作用) |      | FIC > 2 (拮抗作用) |      |
|----------|-----------------------|------|---------------------------|------|-------------------------|------|----------------|------|
|          | 菌株数量                  | 占比/% | 菌株数量                      | 占比/% | 菌株数量                    | 占比/% | 菌株数量           | 占比/% |
| 丁香油+阿莫西林 | 20                    | 58.8 | 8                         | 23.5 | 6                       | 17.7 | 0              | 0    |
| 丁香油+头孢氨苄 | 33                    | 97.0 | 1                         | 3.0  | 0                       | 0    | 0              | 0    |
| 丁香油+头孢吡肟 | 22                    | 64.7 | 5                         | 14.7 | 7                       | 20.6 | 0              | 0    |

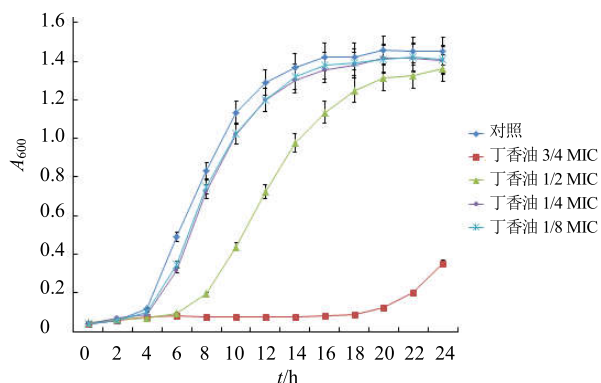


图 2 丁香油对 MRSA 标准株 ATCC43300 生长的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Growth curve of MRSA treated with clove oil ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 丁香油与头孢氨苄联合使用对 MRSA 生长的影响

采用生长曲线法测定了丁香油和头孢氨苄联合使用对 MRSA 标准株 ATCC43300 生长的影响。结果见图 3。由图 3 可知，未加药物的对照组细菌 6 h 进入对数生长期，14 h 进入稳定期；经 1/4 MIC 头孢氨苄处理后，MRSA 生长受到一定程度抑制，迟

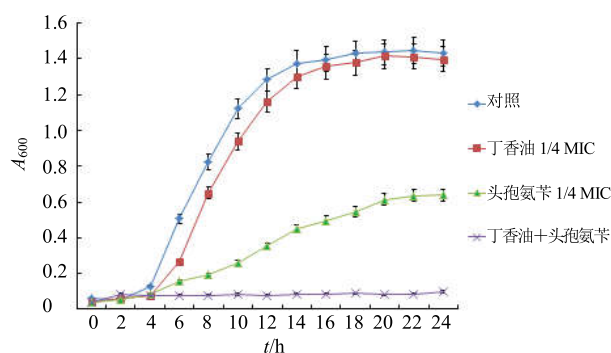


图 3 丁香油与头孢氨苄联合使用对 MRSA 标准株 ATCC43300 生长的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Growth curve of MRSA treated with clove oil and cefalexin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

缓期稍微延长，MRSA 生长总量较对照组稍微下降；经 1/4 MIC 丁香油处理后，MRSA 生长总体影响较小；但同时经 1/4 MIC 丁香油和 1/4 MIC 头孢氨苄联合处理后，MRSA 生长受到显著抑制，24 h 内未见 MRSA 明显生长，生长几乎处于抑制状态。说明丁香油能显著增强头孢氨苄抗 MRSA 活性。

## 4 讨论

丁香具有极高的药食两用价值，资源丰富，是

我国传统进口“南药”之一，主要产于热带地区，如坦桑尼亚、印度尼西亚等地，在我国海南、广东、广西、云南等热带地区也相继引种栽培<sup>[14]</sup>。丁香化学成分复杂，主要含有挥发油、黄酮、有机酸等成分，黄酮类成分通常具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤以及增强免疫力等广泛的药理活性<sup>[29]</sup>。目前，丁香相对研究较多的是其挥发油，对其他成分的研究报道则较少<sup>[29]</sup>。本研究在前期丁香油自身抗菌活性研究的基础上，深入探讨丁香油与临床最常用的  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用抗临床“超级细菌”MRSA 作用，解决目前抗 MRSA 感染用药难和难用药的现状。在指导 MRSA 感染控制及新药研发方面具有重要的理论和现实意义。

丁香油作为一种天然提取物，被广泛用于食品工业保鲜<sup>[19]</sup>。曾荣等<sup>[15]</sup>采用结合杯碟法和双层平板法测定丁香对受试菌（主要为引起食物腐败的细菌）的抑制作用，发现丁香精油和丁香酚抑菌谱广，丁香酚为丁香精油的主要成分，对革兰阴性杆菌效果优于丁香精油。丁香酚是欧盟、美国和中国都允许使用的食品添加剂，关于丁香油的研究主要是对食品腐败菌（大肠杆菌、痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌）的体外抗菌活性研究<sup>[30]</sup>。目前，未见丁香油抗 MRSA 活性研究报道，亦未见有丁香油协同增效  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗 MRSA 作用报道。

本研究以临床分离的 MRSA 多重耐药菌株为研究对象，分别分析了丁香油自身抗 MRSA 活性，以及丁香油与 3 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素（阿莫西林、头孢氨苄、头孢吡肟）联合使用的抗 MRSA 活性。结果表明，丁香油具有明显的体外抗 MRSA 活性，提示丁香油可用于治疗临床 MRSA 感染；联合药敏实验发现，丁香油与 3 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用时以协同作用（58.8%~97.0%）为主；其次为相加作用（3.00%~23.5%）；少数菌株表现为无关作用，无拮抗作用，其中与头氨苄肟联合使用的效果最好，协同率为 97%。提示丁香油可与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用，可增强  $\beta$ -内酰胺类抗生素临床治疗 MRSA 感染疗效，降低药物用量。而丁香油体内自身的抗 MRSA 感染疗效及与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用抗 MRSA 感染的疗效如何，丁香油是否具有增强喹诺酮类等其他抗生素的体外活性，有待后续深入研究。

通过分析不同质量浓度丁香油对 MRSA 的生

长抑制作用，以及丁香油与头孢氨苄的联合用药对 MRSA 生长曲线的影响，发现丁香油自身对 MRSA 生长的作用呈明显浓度依赖性，当与头孢氨苄联合使用时，两者均只需要单用时 1/4 的浓度，MRSA 的生长几乎被完全抑制，与体外活性的协同增效作用结果一致。初步的丁香油抗 MRSA 作用机制分析发现，丁香油能明显延长 MRSA 的延滞期，降低细菌生长量，但其深入的作用机制是否与现有抗生素的作用机制，即抑制细菌细胞壁合成、影响胞膜渗透性和影响核酸代谢等<sup>[31-32]</sup>相似，是否与丁香酚的作用机制相同<sup>[17]</sup>，尚未阐明，其具体的抗 MRSA 作用机制有待于后续深入研究。

本研究仅对丁香油与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用抗 MRSA 体外活性及作用机制进行了初步探讨，而关于其体内抗 MRSA 感染疗效及作用机制仍不清楚，机体作为一个复杂的系统，MRSA 感染易受内外环境的影响。因此，本课题组后续将进一步建立 MRSA 感染模型，深入研究丁香油体内单独使用，以及与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合使用的抗 MRSA 感染疗效，分析丁香油在体内抗 MRSA 感染的作用机制，探讨其急性和长期毒性，为后续丁香油在抗 MRSA 感染新药中的应用奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Lowy F D. *Staphylococcus aureus* infections [J]. *New Engl J Med*, 1998, 339: 520-532.
- [2] 卢克鹏, 宋洪涛. 糖肽类抗生素在治疗 MRSA 感染中的 PK/PD 与给药方案的研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(11): 952-957.
- [3] Klevens R M, Morrison M A, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States [J]. *JAMA*, 2007, 298(15): 1763-1771.
- [4] de Kraker M E, Wolkewitz M, Davey P G, et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: Excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood stream infections [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(4): 1598-1605.
- [5] Kluytmans J, Struelens M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital [J]. *BMJ*, 2009, 338(7693): 532-537.
- [6] 王明强, 张思森, 刘小军, 等. 替考拉宁与万古霉素及利奈唑胺治疗 MRSA 感染患者的疗效评价 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(17): 3923-3924.
- [7] Giltner C L, Kelesidis T, Hindler J A, et al. Frequency of susceptibility testing for patients with persistent

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(1): 357-361.
- [8] Stryjewski M E, Corey R G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolving pathogen [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 58(S1): 10-19.
- [9] 郝佳, 刘哲, 张瑜, 等. 苦参、绿茶及紫苏叶提取物联用对金黄色葡萄球菌的体外活性研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(5): 296-298.
- [10] Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(7): 2836-2840.
- [11] Tan X, Yang D, Yang G, et al. The investigation of inhibiting quorum sensing and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation from *Liriodendron hybrid* [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(3): 903-908.
- [12] Chen X, Shang F, Meng Y, et al. Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(12): 8486-8491.
- [13] Liu I X, Durham D G, Michael R. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52(3): 361-366.
- [14] 屠寒, 江汉美, 卢金清, 等. 丁香药理作用研究进展 [J]. 香料香精化妆品, 2015(5): 59-62.
- [15] 曾荣, 陈金印, 林丽超. 丁香精油及丁香酚对食品腐败菌的抑菌活性研究 [J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(4): 852-857.
- [16] Bhuiyan M N I, Begum S, Nandi N C, et al. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston) [J]. *Afr J Plant Sci*, 2010, 6(16): 451-454.
- [17] 马艳玲, 李海贤, 曾荣. 丁香酚对金黄色葡萄球菌抗菌作用的探究 [J]. 中国酿造, 2017, 36(8): 130-133.
- [18] 马莎莎, 赵震宇, 刘平怀, 等. 丁香不同提取方法提取物的抗氧化活性 [J]. 精细化工, 2018, 35(2): 218-227.
- [19] Ozcan M M, Arslan D. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils [J]. *Food Chem*, 2011, 129(1): 171-174.
- [20] Kong B, Zhang H, Xiong Y L. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action [J]. *Meat Sci*, 2010, 85(4): 772-778.
- [21] 周建新, 许华, 金浩. 丁香油抑菌效果与抑菌成分的研究 [J]. 食品工业, 2003, 21(3): 24-26.
- [22] 陈蔚文, 李茹柳, 叶富强, 等. 连香胶囊治疗胃院痛的临床观察与药理实验研究 [J]. 中国新药与临床药理, 1999, 10(5): 268-271.
- [23] 谭延华, 何西利, 高健, 等. 丁香酚对氧自由基的清除作用 [J]. 西北药学杂志, 1996, 11(1): 30-31.
- [24] 朱金段, 袁德俊, 林新颖. 丁香的药理研究现状及临床应用 [J]. 中国药物经济学, 2013(1): 32-35.
- [25] 伍振峰, 王赛君, 杨明, 等. 中药挥发油提取工艺与装备现状及问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 224-227.
- [26] 朱生梁, 马淑影, 王小素, 等. 丁香降气汤治疗反流性食管炎 50 例临床观察 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(1): 19-20.
- [27] Janardhanan S, Mahendra J, Girija A S, et al. Antimicrobial effects of *Garcinia Mangostana* on cariogenic microorganisms [J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(1): 19-22.
- [28] 张肖冰, 杨事达, 姚志成, 等. 替加环素与 5 种抗生素对多重耐药鲍曼不动杆菌体外联合药敏实验的研究 [J]. 微生物学杂志, 2017, 37(5): 82-87.
- [29] 孟佳敏, 江汉美, 卢金清, 等. 丁香高效液相指纹图谱研究 [J]. 中国药师, 2018, 21(10): 1762-1765.
- [30] 徐航, 龙娜娜, 林琳, 等. 草果油抗 MRSA 体外活性研究 [J]. 成都医学院学报, 2017, 12(3): 241-246.
- [31] 杨滋渊, 李巧如, 赵院莉, 等. 丁香挥发油的抗菌作用研究 [J]. 西北药学杂志, 2007, 22(4): 181.
- [32] Roemer T, Schneider T, Pinho M G. Auxiliary factors: A chink in the armor of MRSA resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16(5): 538-548.