

丁香挥发油联合喹诺酮类抗生素抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌作用研究

梁小雪^{1,2}, 高鸣乡^{3#}, 邱敏², 孙丰慧^{1,2}, 代敏^{2,4}, 任科^{2,4*}

1. 成都医学院 四川养老与老年健康协同创新中心, 四川 成都 610500

2. 成都医学院检验医学院, 四川 成都 610500

3. 成都医学院临床医学院, 四川 成都 610500

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

摘要:目的 探究丁香挥发油的耐药性和丁香挥发油联合喹诺酮类抗生素抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的体外活性,为后续丁香挥发油联合抗生素治疗 MRSA 感染提供科学依据。方法 采用微量稀释法分别测定丁香挥发油、4 种喹诺酮类抗生素(莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星)的最小抑菌浓度(MIC);棋盘稀释法测定丁香挥发油与 4 种喹诺酮类抗生素联用的部分抑菌浓度(FIC)指数;生长曲线法分析丁香挥发油联合 4 种喹诺酮类抗生素对 MRSA 的抑制作用;通过耐药性诱导实验,分析丁香挥发油对 MRSA 标准株 ATCC33591 耐药诱导 30 代后的 MIC 变化,分析丁香挥发油的耐药性。结果 耐药性分析发现,MRSA 临床分离株对莫西沙星的耐药率(88.57%)最高,其次为环丙沙星和左氧氟沙星(77.14%),耐药率相对最低的为诺氟沙星(74.29%)。FIC 指数分析显示,丁香挥发油分别与莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星和诺氟沙星联用呈现不同程度的相互作用,其中协同作用分别为 42.86%、37.15%、34.28%、34.28%,相加作用分别为 28.57%、25.71%、22.86%、42.86%,无关作用分别为 28.57%、20.00%、42.86%、22.86%,与左氧氟沙星联合使用时 17.14% 实验菌株呈拮抗作用。生长曲线结果显示,丁香挥发油与喹诺酮类抗生素联用对 MRSA 有明显的协同抑制作用。诱导耐药实验结果显示,亚抑菌浓度的丁香挥发油连续诱导 MRSA 菌株 30 代后, MIC 无变化;而相同条件下环丙沙星的 MIC 升高至原来的 16 倍,说明丁香挥发油不易产生耐药。结论 丁香挥发油不易产生耐药性;与喹诺酮类抗生素联用时呈现不同的作用,多数 MRSA 菌株呈协同和相加作用,可降低临床喹诺酮类抗生素抗 MRSA 感染的用量。

关键词: 丁香挥发油; 喹诺酮类抗生素; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 部分抑菌浓度; 耐药诱导

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)23-5998-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.012

Effect of clove oil combined with quinolones antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

LIANG Xiao-xue^{1,2}, GAO Ming-xiang³, QIU Min², SUN Feng-hui^{1,2}, DAI Min^{2,4}, REN Ke^{2,4}

1. Sichuan Collaborative Innovation Center for Elderly Care and Health, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

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

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

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

Abstract: **Objective** To investigate the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of clove oil combined with quinolones antibiotics *in vitro*, and provide scientific evidences for the treatment of MRSA infection by clove oil combined with quinolones antibiotics. **Methods** Minimal inhibitory concentrations (MICs) of clove oil and four quinolones antibiotics (moxifloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin) were determined by microdilution method; Fractional inhibitory

收稿日期: 2020-06-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31970137); 国家级大学生创新创业训练项目(201913705026); 四川省大学生创新创业训练项目(201813705085, S201913705107); 成都市科技局科技惠民技术研发项目(2016-HM01-00362-SF); 成都医学院四川养老与老年健康协同创新中心研究项目(YLZBZ1806); 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: 梁小雪(1995—),女,四川德阳人,在读硕士,主要从事细菌耐药及抗菌药物筛选研究。E-mail: 18328078898@163.com

***通信作者** 任科(1986—),男,四川茂县人,博士,讲师,主要从事病原微生物感染控制研究。E-mail: renke@cmc.edu.cn

#共同第一作者 高鸣乡(1999—),女,四川宜宾人,在读本科,主要从事细菌耐药及抗菌药物筛选研究。E-mail: 3119684906@qq.com

concentration (FIC) indexes of clove oil combined with four quinolones antibiotics were determined by chessboard dilution method; Inhibition effect of MRSA by clove oil combined with four quinolones antibiotics was analyzed by growth curve method. MIC changes were analyzed when MRSA standard strain ATCC33591 was induced 30 generations with clove oil. **Results** A total of 35 strains of MRSA isolated from clinical patients showed that the highest resistance rate was moxifloxacin (88.57%), followed by ciprofloxacin and levofloxacin (77.14%), and the lowest resistance rate was norfloxacin (74.29%). The results of FIC index analysis showed that the different synergistic action effects of clove oil with moxifloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin and ornofloxacin, were 42.86%, 37.15%, 34.28% and 34.28%, respectively; The additive effects of which were 28.57%, 25.71%, 22.86% and 42.86%, respectively; The unrelated effects of that were 28.57%, 20.00%, 42.86% and 22.86%, respectively. Among them, there was partial antagonism in experimental strains when combined with levofloxacin, accounting for 17.14%. The growth curve showed that the combination of clove oil and quinolone antibiotics had a significant synergistic inhibition on MRSA. The results of induced drug resistance test showed that MIC did not change after 30 generations of continuous induction with the clove oil, but increased to 16 times of that of ciprofloxacin under the same condition, which indicated that the clove oil was not easy to make MRSA resistant. **Conclusion** Clove oil is not easy to produce drug resistance. They showed different interactions on each other when clove oil combined with quinolones antibiotics, and most strains of MRSA isolated from clinical patients had obvious synergistic and additive inhibition effect. The dosage of quinolones antibiotics could be cut when clove oil combined with quinolones antibiotics for treating MRSA infection.

Key words: clove oil; quinolones antibiotics; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; fractional inhibitory concentration; drug resistance induction

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 作为医院内感染最主要和最重要的多重耐药菌之一, 受到人们的广泛关注。自 20 世纪 80 年代, MRSA 感染率一直居高不下^[1], 金黄色葡萄球菌 (USA300) 在美国曾出现过爆发式流行^[2]。我国 2018 年细菌耐药监测网调查结果显示, MRSA 在我国平均检出率为 30.9%, 较 1989 年数据 (检出率 42.7%) 虽有降低, 但仍是严重的国家之一^[3]。目前治疗 MRSA 感染的一线药物为利奈唑胺、万古霉素、达托霉素、喹诺酮类等抗生素, 随着抗生素的广泛使用, MRSA 耐药性不断增加^[4], 抗生素的耳、肾毒性等不良反应也限制了其广泛推广^[5]。因此, 开发新型抗 MRSA 感染的药物迫在眉睫。中药具有广谱抗菌、作用靶点多、不易产生耐药性等特点, 已成为抗多重耐药菌感染药物筛选的研究热点^[6]。

丁香为桃金娘科植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb 的干燥花蕾^[7], 是重要的药食两用植物, 产于马来西亚、印度尼西亚、东非沿岸国家, 我国海南和广西也有栽培, 常用作食品的天然香料^[8]。丁香挥发油具有抗菌、消炎、镇痛、抗氧化、保护消化系统等药理作用^[8-12]。研究表明, 丁香挥发油具有明显的广谱抗细菌 (如大肠杆菌、幽门螺旋杆菌、金黄色葡萄球菌等)^[9,13-14]和抗真菌作用^[15]。课题组前期研究发现, 丁香挥发油不仅自身对多重耐药菌 MRSA 具有明显的抗菌作用, 还可增强 β -内酰胺类抗生素抗 MRSA 作用^[16]。为深入探

讨丁香挥发油与喹诺酮类抗生素的联用效果和丁香挥发油的耐药性, 本研究对丁香挥发油与喹诺酮类抗生素联用效果进行分析, 并对丁香挥发油进行耐药性诱导, 分析耐药性, 为后续抗 MRSA 感染药物的综合开发与应用奠定基础, 亦为中药与抗生素联用抗 MRSA 感染提供科学依据。

1 材料

1.1 菌株

质控菌株: 金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923, 购自美国典型菌种保藏中心。MRSA 标准株: ATCC33591, 购自美国典型菌种保藏中心。MRSA 临床分离株: 35 株, 分离于四川省妇幼保健院, 经 VITEK32、16S rRNA 头孢西丁抗菌药物敏感实验和 *mecA* 基因鉴定。菌株来源和编号见表 1。

1.2 药材

丁香购自北京同仁堂, 经成都医学院李弈教授鉴定为桃金娘科植物丁香 *E. caryophyllata* Thunb 的干燥花蕾。

1.3 试剂

莫西沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星, 质量分数均大于 98%, 购自北京索莱宝科技有限公司; 环丙沙星 (质量分数 > 98%), 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 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; 0.5 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; 96 孔板, 购自加拿大 Jet Biofit 公司。

表 1 受试菌编号及丁香的 MIC

Table 1 Number of experimental bacteria and MIC of *E. caryophyllata*

序号	菌株编号	菌种名称	丁香 MIC/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	序号	菌株编号	菌种名称	丁香 MIC/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	ATCC25923	金黄色葡萄球菌质控株	510	20	8301	MRSA 临床株	250
2	ATCC33591	MRSA 标准株	510	21	1248	MRSA 临床株	510
3	1158	MRSA 临床株	510	22	4445	MRSA 临床株	510
4	7006	MRSA 临床株	250	23	7009	MRSA 临床株	510
5	7007	MRSA 临床株	510	24	942	MRSA 临床株	250
6	1145	MRSA 临床株	250	25	7015	MRSA 临床株	250
7	1093	MRSA 临床株	250	26	7001	MRSA 临床株	250
8	7017	MRSA 临床株	250	27	1303	MRSA 临床株	510
9	1155	MRSA 临床株	510	28	8311	MRSA 临床株	250
10	1014	MRSA 临床株	510	29	8318	MRSA 临床株	250
11	1300	MRSA 临床株	510	30	1334	MRSA 临床株	250
12	5188	MRSA 临床株	510	31	1239	MRSA 临床株	250
13	8211	MRSA 临床株	510	32	1412	MRSA 临床株	510
14	1049	MRSA 临床株	250	33	7020	MRSA 临床株	510
15	1246	MRSA 临床株	250	34	7012	MRSA 临床株	510
16	906	MRSA 临床株	510	35	7011	MRSA 临床株	510
17	1087	MRSA 临床株	510	36	7029	MRSA 临床株	250
18	8303	MRSA 临床株	250	37	7005	MRSA 临床株	250
19	1322	MRSA 临床株	250				

1.4 仪器

生物安全柜,购自苏州安泰空气技术有限公司;台式恒温振荡器,购自上海精宏实验设备有限公司;多功能酶标仪,购自赛默飞世尔科技公司。

2 方法

2.1 丁香挥发油的提取

参考《中国药典》2015 年版^[9],水蒸气蒸馏法提取丁香挥发油,无水十二烷基磺酸钠去水处理,测其密度($\rho=652.8\text{ mg/mL}$),存放于棕色瓶,4℃保存备用。

2.2 菌液制备

将受试菌接种于营养琼脂平板活化,37℃过夜培养,挑取单个菌落于无菌生理盐水配制菌悬液,调整菌悬液浓度为 0.5 个麦氏浊度,以 MHB 无菌培养液稀释 100 倍备用。

2.3 药液制备

以聚山梨酯 80 为乳化剂,制备质量浓度为 130.56 mg/mL 的丁香挥发油乳化液;喹诺酮类抗生素溶于无菌水配制成质量浓度为 4.096 mg/mL 的溶液,于 4℃保存备用。二倍稀释法用 MHB 培养液对药物进行倍比稀释,分别将丁香挥发油乳化液和抗生素溶液稀释成 12 个不同浓度梯度的稀释液,用于测定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和分级抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)。

2.4 丁香挥发油联合喹诺酮类抗生素体外抗 MRSA 作用

2.4.1 MIC 测定 以 ATCC25923 为质控菌株,用 96 孔板微量稀释法分别测定丁香挥发油与 4 种喹诺酮类抗生素(莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星)的 MIC 值。方法参考文献^[14,16]并进行适当改进,在 96 孔板中先后加入 100 μL 不同浓度的稀释药液、100 μL 稀释菌液,使丁香挥发油的终质量浓度分别为 20~32 640 $\mu\text{g/mL}$,喹诺酮类抗生素的终质量浓度为 0.5~1 024 $\mu\text{g/mL}$,于 37℃恒温培养 18 h,观察受试菌的生长情况(肉眼观察浑浊度)。以能抑制受试菌生长的最低药物浓度为该受试菌的 MIC 值,以仅含培养液为空白对照,仅加菌液不加药物为阳性对照,仅加药液不加菌液为阴性对照。每株受试菌实验重复 3 次,每次 3 个平行。

2.4.2 FIC 测定 根据丁香挥发油和 4 种喹诺酮类抗生素的 MIC 结果,采用倍比稀释法分别稀释丁香挥发油、莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星,使其终浓度分别为 1/16 MIC~2 MIC。采用微量棋盘稀释法^[16]测定丁香挥发油分别与莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星联用的 MIC,分析其 FIC。

2.5 丁香挥发油联合喹诺酮类抗生素对 MRSA 生长曲线的影响

2.5.1 丁香挥发油对 MRSA 生长曲线的影响 以

MRSA 标准株 ATCC33591 为受试菌, 活化后用生理盐水将其配制成 0.5 个麦氏浊度备用。实验分为阳性对照组 (仅加菌液不加药液)、丁香挥发油 (含 3/4 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、1/8 MIC、1/16 MIC 的丁香挥发油, MIC 为 510 $\mu\text{g/mL}$) 组。以不加菌液仅加同浓度药液的为阴性对照组, 用于消减药物颜色干扰。在含 MHB 培养液中分别加入 1% 菌液量 and 对应药液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 24 h, 每 2 小时无菌取样 1 次, 用酶标仪测定 600 nm 波长的吸光度 (A), 其中实验组 A_{600} 为实验处理组与同浓度同时段阴性组的吸光度之差。以 t 为横坐标 (X), A_{600} 为纵坐标 (Y), 绘制 MRSA 生长曲线, 分析不同浓度丁香挥发油对 MRSA 生长的影响。

2.5.2 丁香挥发油联合喹诺酮类抗生素对 MRSA 生长曲线的影响 以 MRSA 标准株 ATCC33591 为受试菌, 结合 FIC 结果, 选择 1/4 MIC (127.5 $\mu\text{g/mL}$) 丁香挥发油与 1/4 MIC 喹诺酮类抗生素 (以环丙沙星为例) 联用, 观察对 MRSA 生长的影响。实验分为阳性对照组 (仅含菌液不含药液)、联合用药组 (1/4 MIC 丁香挥发油 + 1/4 MIC 环丙沙星)、丁香组 (1/4 MIC)、环丙沙星 (1/4 MIC) 组。以不加菌液仅加同浓度药液的为阴性对照组, 以消减药物颜色干扰。按“2.5.1”项下方法考察丁香挥发油与左氧氟沙星、莫西沙星和诺氟沙星联用, 对 MRSA 生长曲线的影响。

2.6 丁香挥发油对 MRSA 的诱导耐药作用

以 ATCC33591 标准株为受试菌, 分析丁香挥发油的耐药性。在 MBH 培养液中分别加入受试菌液 (0.5 个麦氏浊度) 和亚抑菌浓度 (终浓度 1/2 MIC, 255 $\mu\text{g/mL}$) 的丁香挥发油, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 恒温振荡培养 24 h, 即为第 1 代诱导菌株。将第 1 代诱导菌株按上述方法进行第 2 代诱导, 连续诱导至 30 代。以环丙沙星为喹诺酮类抗生素代表, 作为抗生素对照组, 同样方法进行亚抑菌浓度处理, 连续耐药性诱导 30 代。每代诱导时进行 3 个平行实验。96 孔板微量稀释法测定诱导前和每诱导 5 代后的 MIC, 即测定 MIC₀、MIC₅、MIC₁₀、MIC₁₅、MIC₂₀、MIC₂₅、MIC₃₀, 比较分析丁香挥发油和喹诺酮类抗生素连续耐药性诱导 30 代后 MIC 的变化。

2.7 数据统计与分析

实验数据使用 SPSS 21.0 统计分析, 采用软件 OriginPro 2018 绘制生长曲线。MIC₅₀ 为抑制 50% 受试菌株生长所需的最低药物浓度, MIC₉₀ 定义为

抑制 90% 受试菌株生长所需的最低药物浓度。按参考文献^[17], 计算 FIC 指数 (FICI) 并进行结果判断。FICI ≤ 0.5 为协同作用, $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ 为相加作用, $1 < \text{FICI} \leq 2$ 为无关作用, FICI > 2 为拮抗作用。

$\text{FICI} = \text{甲药联用的 MIC} / \text{甲药单用的 MIC} + \text{乙药联用的 MIC} / \text{乙药单用的 MIC}$

3 结果

3.1 丁香挥发油和喹诺酮类抗生素体外抗 MRSA 作用

如表 1 所示, 丁香挥发油的 MIC 为 250~510 $\mu\text{g/mL}$ 。如表 2 所示, 环丙沙星的 MIC 为 4~256 $\mu\text{g/mL}$, 左氧氟沙星的 MIC 为 0.5~32 $\mu\text{g/mL}$, 莫西沙星的 MIC 为 0.5~128 $\mu\text{g/mL}$, 诺氟沙星的 MIC 为 1~512 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 喹诺酮类抗生素的 MIC 值分布

Table 2 MIC value distribution of four kinds of quinolones antibiotics

药物	MIC/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	数量/ 株	药物	MIC/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	数量/ 株
莫西沙星	>0.5	3	环丙沙星	>0.5	8
	1	1		1	0
	2	2		2	0
	4	3		4	1
	8	10		8	2
	16	3		16	0
	32	0		32	4
	64	0		64	8
	128	12		128	11
	256	1		256	1
左氧氟沙星	512	0	诺氟沙星	512	0
	>0.5	5		>0.5	0
	1	3		1	3
	2	1		2	3
	4	2		4	3
	8	6		8	0
	16	5		16	1
	32	13		32	1
	64	0		64	0
	128	0		128	5
	256	0		256	11
	512	0		512	8

如表 3 所示, 35 株 MRSA 临床分离株对莫西沙星的耐药率最高 (88.57%); 其次为环丙沙星和左氧氟沙星, 耐药率均为 77.14%; 耐药率相对最低的为诺氟沙星 (74.29%), 说明实验中的 MRSA 临床分离株绝大多数对喹诺酮类抗生素耐药, 只有少数菌株表现敏感。

3.2 丁香挥发油与喹诺酮类抗生素联用对 MRSA 的作用

如表 4 所示, 丁香挥发油与 4 种喹诺酮类抗生

表 3 35 株 MRSA 临床分离株对喹诺酮类抗生素的耐药性分析

Table 3 Drug resistance of 35 strains of MRSA isolated from clinical patients to quinolones antibiotics

药物	敏感		中介		耐药	
	数量/株	占比/%	数量/株	占比/%	数量/株	占比/%
莫西沙星	3	8.57	1	2.86	31	88.57
左氧氟沙星	8	22.86	0	0	27	77.14
环丙沙星	8	22.86	0	0	27	77.14
诺氟沙星	9	25.71	0	0	26	74.29

表 4 丁香挥发油与 4 种喹诺酮类抗生素联用对 MRSA 的作用

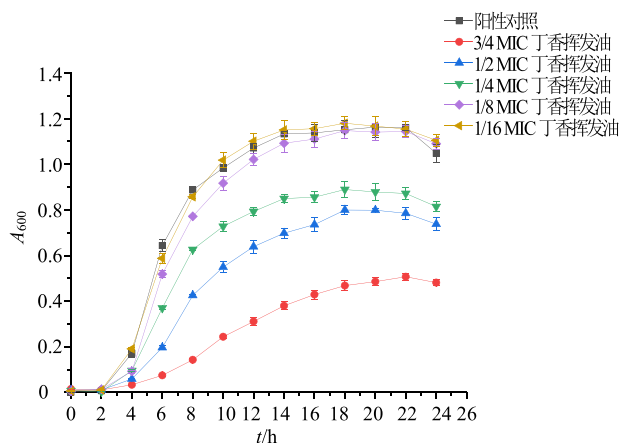
Table 4 Effect of clove oil combined with four kinds of quinolones antibiotics on MRSA

药物	协同作用		相加作用		无关作用		拮抗作用	
	数量/株	占比/%	数量/株	占比/%	数量/株	占比/%	数量/株	占比/%
丁香挥发油+莫西沙星	15	42.86	10	28.57	10	28.57	0	0
丁香挥发油+左氧氟沙星	13	37.15	9	25.71	7	20.00	6	17.14
丁香挥发油+环丙沙星	12	34.28	8	22.86	15	42.86	0	0
丁香挥发油+诺氟沙星	12	34.28	15	42.86	8	22.86	0	0

素联用呈现不同的作用,其中与诺氟沙星联用的效果最好,77.14%菌株呈协同和相加作用,22.86%菌株呈无关作用;其次为莫西沙星,71.43%菌株呈协同和相加作用,28.57%菌株呈无关作用;再次为环丙沙星,57.14%菌株呈协同和相加作用,42.86%菌株呈无关作用;效果最差的是左氧氟沙星,62.86%菌株呈协同和相加作用,20%菌株呈无关作用,17.14%菌株呈拮抗作用。说明丁香挥发油与喹诺酮类抗生素联用的作用因菌株、药物差异而不同。

3.3 丁香挥发油对 MRSA 生长曲线的影响

如图 1 所示,丁香挥发油可抑制 MRSA 生长,呈剂量相关性。在实验浓度范围内,3/4 MIC 丁香挥发油抑制效果最好;1/8 MIC 及以下浓度无明显抑制作用。

图 1 丁香挥发油对 MRSA 标准株 ATCC33591 生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 1 Effect of clove oil on growth of MRSA standard strain ATCC33591 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 丁香挥发油与喹诺酮类抗生素联用对 MRSA 生长曲线的影响

如图 2 所示,当细菌无药物处理时(阳性对照组),细菌 2 h 进入对数期;单用 1/4 MIC 丁香或 1/4 MIC 抗生素处理后,滞缓期无明显变化,但细菌生长量减少,生长受到抑制。当 1/4 MIC 丁香挥发油分别与 1/4 MIC 莫西沙星、1/4 MIC 左氧氟沙星、1/4 MIC 环丙沙星、1/4 MIC 诺氟沙星联合处理,均呈明显协同抑制效果。其中与环丙沙星和诺氟沙星联用,迟缓期延长至 4 h,细菌生长总量明显降低,仅有极少量的菌株生长;效果相对较差的是与左氧氟沙星联用,迟缓期无明显变化,仅见细菌生长量减少;效果相对最差的是与莫西沙星联用,仅见部分细菌生长量减少。

3.5 丁香挥发油的耐药性分析

如表 5、图 3 所示,亚抑菌浓度丁香挥发油连续诱导 MRSA 标准株 30 代,丁香挥发油诱导组与空白对照组的 MIC 值一致,即从诱导前到诱导第 30 代后,两者 MIC 均为 510.0 $\mu\text{g/mL}$ 。亚抑菌浓度环丙沙星耐药诱导 30 代后,药物诱导组与空白对照呈明显差异,耐药诱导组的 MIC 由诱导前的 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 16.0 $\mu\text{g/mL}$ (诱导至第 5 代时 MIC 提高为诱导前的 4 倍;诱导至 25 代时, MIC 提高至第 5 代的 4 倍、诱导前的 16 倍),空白对照组的 MIC 始终为 1.0 $\mu\text{g/mL}$,无任何变化。说明丁香挥发油不易产生耐药性,而环丙沙星类抗生素易产生耐药性。

4 讨论

丁香挥发油的主要组分是丁香酚、 β -石竹烯和

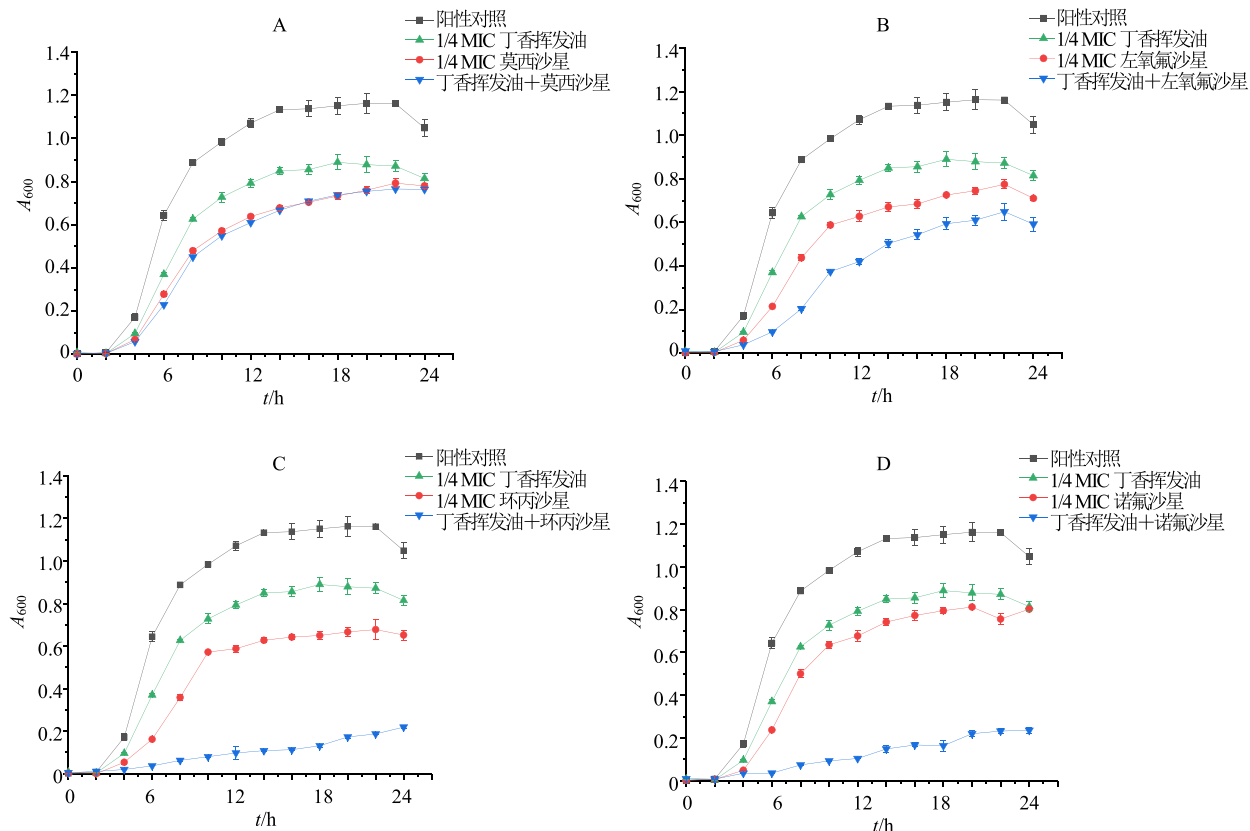


图 2 丁香挥发油分别与莫西沙星 (A)、左氧氟沙星 (B)、环丙沙星 (C)、诺氟沙星 (D) 联用对 MRSA 生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of clove oil combined with moxifloxacin (A), levofloxacin (B), ciprofloxacin (C) and morfloxacin (D) on growth of MRSA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 5 丁香挥发油与环丙沙星耐药诱导后的 MIC 比较分析

Table 5 MIC comparative analysis of clove oil and ciprofloxacin after drug resistance induction

药物	组别	MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)						
		0 代	5 代	10 代	15 代	20 代	25 代	30 代
丁香挥发油	药物诱导	510.0	510.0	510.0	510.0	510.0	510.0	510.0
	空白对照	510.0	510.0	510.0	510.0	510.0	510.0	510.0
环丙沙星	药物诱导	1.0	4.0	4.0	4.0	4.0	16.0	16.0
	空白对照	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

注: 药物诱导组用 1/2 MIC 丁香挥发油或环丙沙星进行耐药诱导, 空白对照组为自然传代培养

Note: The drug induction group was induced with 1/2 MIC clove volatile oil or ciprofloxacin, and the blank control group was subcultured naturally

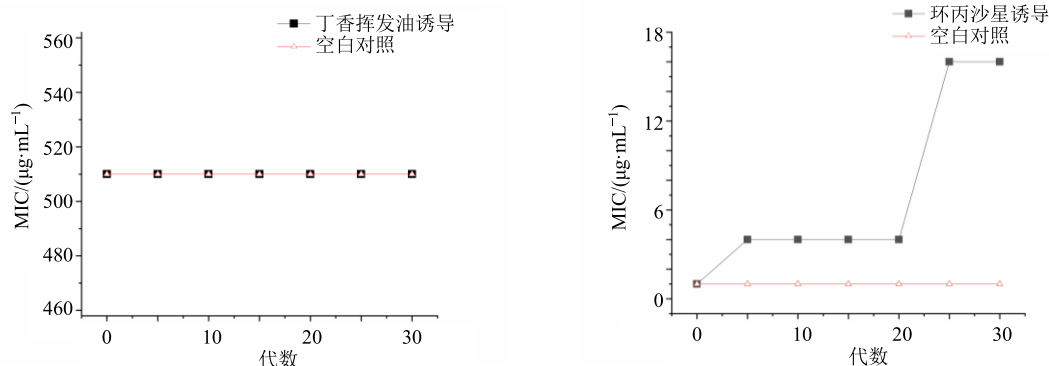


图 3 丁香挥发油与环丙沙星耐药诱导后的 MIC 变化趋势

Fig. 3 MIC comparative analysis of clove oil and ciprofloxacin after induction of drug resistance

乙酰基丁香酚^[18]。现代研究表明,丁香挥发油具有麻醉^[19]、抗氧化^[20]、抗病毒^[21]等药理活性。课题组前期研究发现,丁香精油具有广谱的抗菌活性^[22],对金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、肠球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和白假丝酵母菌 7 个不同种属细菌和真菌的抗菌活性。丁香作为一种药食两用的植物,其挥发油是食品中的重要天然香料,不仅具有广泛的抗菌活性,且不良反应小,因此,丁香作为一种新型安全的抗菌剂具有很大的开发潜力^[23]。

金黄色葡萄球菌是人类的主要病原菌,具有多种毒力因子,MRSA 因对临床常用的抗生素耐药而被称为“超级细菌”^[24]。目前万古霉素等糖肽类抗生素是临床治疗 MRSA 感染的一线药物,但随着耐药性的不断增加和不良反应,导致目前临床面临用药难和难用药的现状。研究发现,丁香挥发油体外具有明显抗 MRSA 活性, MIC 为 255~510 $\mu\text{g/mL}$; 35 株 MRSA 临床分离株以莫西沙星的耐药最高,达 88.57%;其次为环丙沙星和左氧氟沙星,耐药率均为 77.14%;耐药率相对最低的为诺氟沙星,为 74.29%,这与临床抗生素的使用呈明显的正相关,说明抗生素的抗性与其临床使用的选择性压力有关。进一步分析发现,丁香挥发油对 MRSA 临床分离株的 MIC 与其是否对喹诺酮类等抗生素产生耐药性无关,说明中药丁香挥发油与喹诺酮类抗生素无交叉耐药性。

课题组前期研究发现,丁香挥发油不仅自身具有抗 MRSA 作用,且可增强 β -内酰胺类抗生素抗 MRSA 作用^[16],为深入探讨丁香挥发油增强抗生素抗 MRSA 活性,恢复其敏感性作用,本研究选择了临床常用喹诺酮类抗菌药物,分析两者联用的协同增效情况。喹诺酮类抗生素的第 1 代由于严重的不良反应已被临床淘汰^[25],本研究选择临床常用的第 2 代(诺氟沙星和环丙沙星)、第 3 代(左氧氟沙星)、第 4 代(莫西沙星)药物,探讨丁香挥发油是否与喹诺酮类抗生素有联合协同作用。研究发现,丁香挥发油在一定程度上可增强喹诺酮类抗生素抗 MRSA 作用,恢复其敏感性,其中与莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星的协同和相加作用分别为 71.43%、62.86%、57.14%、77.14%,无交互作用分别为 28.57%、20.00%、42.86%、22.86%,课题组前期研究发现,丁香挥发油与 β -内酰胺类抗生素联用的协同抑制率最高可达 97%^[16],说明丁香

挥发油增强喹诺酮类抗生素抗 MRSA 作用较增强 β -内酰胺类抗生素抗 MRSA 作用弱。

此外,本研究发现,当丁香挥发油与左氧氟沙星联用时,17.14% MRSA 临床分离株呈拮抗作用,提示临床不宜将丁香挥发油与左氧氟沙星联合使用。FIC 结果表明,丁香挥发油与 4 种喹诺酮类抗生素对 MRSA 标准株 ATCC33591 均有协同作用;生长曲线法分析证实了丁香挥发油分别与莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星和诺氟沙星联用的协同作用,发现 1/4 MIC 丁香挥发油与 1/4 MIC 喹诺酮类抗生素联用,较任一药物单用均能不同程度地延长 MRSA 生长的迟缓期,降低细菌生长量,呈明显协同作用。其中协同效果以环丙沙星和诺氟沙星为最好,效果相对较差的是左氧氟沙星,效果最差的是莫西沙星。

中药具有广谱抗菌活性、作用靶点多、不易产生耐药性等特点^[6],目前尚未有关于中药丁香挥发油的耐药性研究相关报道。本研究以环丙沙星为抗生素阳性对照,以不含药液为阴性对照,首次用亚抑菌浓度丁香挥发油处理 MRSA 菌液,连续诱导使其生长 30 代,比较分析其 MIC,发现耐药诱导组与空白对照一致, MIC 无任何变化,均为 510.0 $\mu\text{g/mL}$;而与之对应的亚抑菌浓度环丙沙星通过耐药诱导后,诱导至第 5 代时, MIC (4 $\mu\text{g/mL}$) 提高为诱导前 (1 $\mu\text{g/mL}$) 的 4 倍,诱导至第 25 代时, MIC (16 $\mu\text{g/mL}$) 提高至第 5 代 (4 $\mu\text{g/mL}$) 的 4 倍、诱导前 (1 $\mu\text{g/mL}$) 的 16 倍,产生明显的耐药性。说明环丙沙星等喹诺酮类抗生素易产生耐药性,而中药丁香挥发油不易产生耐药性,这可能与中药挥发油活性成分和作用靶点多等有关。因此,中药丁香挥发油具有资源丰富、不易产生耐药性、不良反应小、作用靶点多等特点,较抗生素在治疗感染性疾病方面具有明显的优势,不论是单用还是与抗生素联合应用,在治疗 MRSA 等多重耐药菌感染方面,均有较好的开发与应用前景。

参考文献

- [1] Morvan C, Halpern D, Kénanian G, *et al.* Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12944.
- [2] Diep B A, Gill S R, Chang R F, *et al.* Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J].

- Lancet*, 2006, 367(9512): 731-739.
- [3] 尹朝伦, 陈 兰. MRSA 检出与大陆地区临床研究现状 [J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(3): 369-372.
- [4] 葛 瑛. 《耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家共识》解读 [J]. 中国临床医生, 2014, 42(3): 11-12.
- [5] 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.
- [6] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [7] 张新渐, 韦德勇, 王洪云, 等. 丁香酚生物活性研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(24): 157-160.
- [8] 美 丽, 朱懿敏, 罗 晶, 等. 丁香化学成分、药效及临床应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 222-227.
- [9] 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.
- [10] 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, 8(1): 32-35.
- [11] 孔晓军, 刘希望, 李剑勇, 等. 丁香酚的药理学作用研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(3): 508-511.
- [12] 钱卫东, 刘婵婵, 王 婷, 等. 丁香酚对多重耐药大肠杆菌的抑菌活性及其作用机制研究 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 31-36.
- [13] 赵晨曦, 梁逸曾, 李晓宁. 丁香挥发油化学成分与抗菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(3): 381-385.
- [14] Ács K, Balázs V L, Kocsis B, *et al.* Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18: 227.
- [15] Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(10): 813-829.
- [16] 邱 敏, 龙娜娜, 高鸣乡, 等. 丁香油联用 β -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 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1629-1635.
- [17] Fratini F, Mancini S, Turchi B, *et al.* A novel interpretation of the fractional inhibitory concentration index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains [J]. *Microbiol Res*, 2017, 195: 11-17.
- [18] 杨 冰, 李婷婷, 杨伊涵, 等. 丁香油抗炎镇痛效果的研究 [J]. 绿色科技, 2017(20): 182-185.
- [19] 杨移斌, 夏永涛, 艾晓辉, 等. 丁香酚对俄罗斯鲟的麻醉效果 [J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(1): 17-21.
- [20] 庄军辉. 丁香酚体内外抗氧化作用及其机制研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2014.
- [21] 薛延丰, 陈 浩, 石志琦. 温度对丁香酚防治番茄黄化曲叶病毒病药效的影响 [J]. 西南农业学报, 2015, 28(2): 602-606.
- [22] 陈百万, 袁永红, 王礼柏, 等. 丁香精油抗奶牛乳腺炎病原微生物活性研究 [J]. 绵阳师范学院学报, 2015, 34(2): 51-56.
- [23] Wang Y M, Kong L C, Liu J, *et al.* Synergistic effect of eugenol with colistin against clinical isolated colistin-resistant *Escherichia coli* strains [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018, 7: 17.
- [24] Lakhundi S, Zhang K Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(4): e00020-e00018.
- [25] 张国伟, 明德松, 吴一波, 等. 金黄色葡萄球菌对第二、三、四代喹诺酮类抗菌药物的耐药性 [J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(1): 28.