

中药提取物对金黄色葡萄球菌生物膜作用的研究

元炼^{1,2}, 张姣^{1,2}, 刘兰妹^{1,2}, 陈丹^{1,2}, 姜红宇^{1,2}, 尹业师^{1,2}, 李百元^{1,2*}

¹湖南科技学院化学与生物工程学院; ²湖南科技学院湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室, 永州 425199

摘要:生物膜是细菌耐药和持续性感染的一个重要原因,其给医疗与食品安全带来很大的危害。目前,中草药在防治病原性细菌感染疾病中发挥了积极作用。本研究选取大黄等16味中药,采用回流法提取其活性物质,利用96孔细菌培养法分析其提取物对金黄色葡萄球菌 NCTC 8325 的抑制效果,并且利用结晶紫法研究在其亚抑制浓度下对金黄色葡萄球菌 NCTC 8325 生物膜的影响。抑菌实验结果发现除龙骨风外的15味中药提取物均有抑菌活性;生物膜实验结果发现大黄、虎杖、羌活、女贞子、夏枯草、千里光、辛夷、黄连、砂仁、龙骨风、茵陈、薄荷12味中药的提取物均能抑制金黄色葡萄球菌 NCTC 8325 生物膜形成;豨莶草、凤尾草、铁灵仙、荆芥4味中药的醇提取物对金黄色葡萄球菌 NCTC 8325 生物膜具有抑制作用,但是其水提取物有促进效果。这说明不同溶剂提取的活性物质可能存在差异。本研究的结果在为防治金黄色葡萄球菌感染及生物膜形成的中药开发提供参考。

关键词:生物膜;最小抑菌浓度;金黄色葡萄球菌;中药材

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)8-1273-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.8.001

Effects of Chinese herbal extracts on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*

YUAN Lian^{1,2}, ZHANG Jiao^{1,2}, LIU Lan-mei^{1,2},
CHEN Dan^{1,2}, JIANG Hong-yu^{1,2}, YIN Ye-shi^{1,2}, LI Bai-yuan^{1,2*}

¹College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering;

²Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China

Abstract: The biofilm formation is an important cause of bacterial antibiotic resistance and persistence infection, which brings great harm to the medical and food safety. At present, the use of Chinese herbal medicine has played an positive role in prevention and treatment of pathogenic bacterial infections. In this study, 16 of herbs, including Rhei Radix et Rhizoma, at al. were selected, and the bacteriostatic effects of ethanol and water extracts on *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 were analyzed by 96-well bacterial culture method. The crystal violet assay was used to determine the biofilm formation of *S. aureus* NCTC 8325 under sub-inhibitory concentration of extracts. The results showed that, with the exception of *Caulis AlSophilae* having no inhibitory effects on the *S. aureus* NCTC 8325, 15 extracts had antibacterial activity. Moreover, it was observed that the extracts of Rhei Radix et Rhizoma, *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*, *Notopterygii Rhizoma et Radix*, *Ligustri Lucidi Fructus*, *Prunellae Spica*, *Senecionis Scandentis Hebra*, *Magnoliae Flos*, *Coptidis Rhizoma*, *Amomi Fructus*, *Caulis AlSophilae*, *Artemisiae Scopariae Herba* and *Menthae Haplocalycis Herba* could significantly inhibit the biofilm formation of *S. aureus* NCTC 8325. The ethanol extracts of *Siegesbeckiae Herba*, *Pteridis Multifidae Herba*, *Clematidis Radix et Rhizoma*, *Schizonepetae Herba* had inhibitory effects on the biofilm formation of *S. aureus* NCTC 8325, but the water extracts of *Siegesbeckiae Herba*, *Pteridis Multifidae Herba*, *Clematidis Radix et Rhizoma*, *Schizonepetae Herba* enhanced the biofilm formation. These results indicate that the bioactive compounds in the two extracts may differ due to the use of different extraction solvents. Thus, our findings indicate that some Traditional Chinese medicine can be potential adjunctive agents for the prevention and treatment of *S. aureus* infection.

收稿日期:2022-05-31 接受日期:2022-07-08

基金项目:广东省海洋药物重点实验室开放课题(LMM2020-1);国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目(U21A20411);中央引导地方科技发展专项(2019XF5067)

*通信作者 Tel:86-013763397483; E-mail:lby245239@126.com

Key words: biofilm; minimal inhibitory concentration; *Staphylococcus aureus*; Chinese traditional medicine

细菌生物膜 (bacterial biofilm, BF) 是指细菌为适应自然环境, 在生长过程中逐渐形成附着于生物体或者非生物体表面的特殊功能性结构, 是由细菌细胞及包裹着细菌的自身所分泌的含水聚合性基质所组成的细菌群落^[1]。BF 的形成相当于对于外界的侵扰形成了一层有效的屏蔽, 可使细菌抵御宿主免疫系统和抗菌药物杀伤作用, 从而产生对抗菌药物的耐药性 (是浮游状态的 10 ~ 1 000 倍), 导致感染难以清除^[2], 从而成为当今一大难治的潜在感染源。因此, 仅使用传统的抗生素治疗细菌生物膜感染, 效果将会大打折扣^[3]。

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种常见的食源性致病菌, 它广泛存在于自然环境当中。金黄色葡萄球菌的一个重要的特点是可以使其感染部位形成生物膜, 使这些菌株的感染更加难以治疗^[4]。治疗生物膜的状态下金黄色葡萄球菌, 必须使用更高浓度的抗生素, 但是抗生素的大量使用会导致耐药性的发展, 并且可能会引起协同细菌感染疾病的发生。近年来也报道了一些新的策略被尝试去应对生物被膜的感染, 包括密度感应系统猝灭剂以及抗生素联用密度感应系统猝灭剂等, 但是这些方法没有被批准使用^[5]。因此, 从自然界中寻找能抑制生物膜形成的天然抗菌剂成为重要的选择。

世界卫生组织预测全球 25% 的现代用药直接或间接地与药用植物相关, 其中 1981 年到 2019 年批准使用的 162 种抗菌类药物中有 94 种来源于天然产物^[6]。药用植物是生物活性分子的主要来源之一, 但是从药用植物中筛选抗生物膜抑菌剂还处于初步阶段。目前国际上已经报道了一些药用植物如破子草、黄花菜和姜黄的提取物等表现出抑制金黄色葡萄球菌生物膜的活性^[7-9]。中药具有多组分、多靶点和多作用且不易产生耐药性的特点, 因而在抗菌治疗具有良好的应用前景。目前关于中草药抑制金黄色葡萄球菌生物膜的研究也有一些报道: Wang 等^[10]发现银杏外种皮提取物以浓度依赖的方式抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成; Li 等^[11]研究发现中药诃子能明显地抑制金黄色葡萄球菌生物膜形成, 同时还具有较好的抑菌效果; Liao 等^[12]发现鱼腥草水提物可以有效抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成等。因此, 药用植物是挖掘病原菌生物膜抑制剂的重要来源。但是这些药用植物的研究大都是

基于其抑菌活性的前提下分析其生物膜功能, 这可能会因为提取物的抑菌作用干扰试验结果的判断, 也可能会漏筛没有抑菌但有生物膜抑制活性的植物提取物。因此, 本研究选择大黄等 16 味地方特色的中药材为研究对象, 分析不同溶剂提取物对金黄色葡萄球菌生长的影响, 在此基础上选择亚抑菌浓度提取物分析其对生物膜的影响, 旨在为中药抗生物膜形成的研究及其药物研发提供指导。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

菌株金黄色葡萄球菌 NCTC 8325 由中国科学技术大学孙宝林教授课题组惠赠。大黄、虎杖、羌活、女贞子、夏枯草、千里光、辛夷、豨莶草、凤尾草、铁灵仙、黄连、砂仁、荆芥、茵陈、薄荷、龙骨风购自永州市永懿中药饮片有限公司, 经湖南科技学院化学与生物工程学院陈小明副教授鉴定。胰酪大豆胨液体培养基 (trypticase soy broth, TSB)、胰酪大豆胨琼脂培养基 (tryptose soya agar, TSA) 购自广东环凯生物科技有限公司。95% 乙醇 (分析纯) 购自成都金山化学试剂有限公司。结晶紫染料购自天津市光复精细化工研究所。针筒式滤膜过滤器 ($\Phi 13$ mm, 0.22 μm) 购自天津市领航实验设备股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 中药的预处理

将购买的大黄、虎杖、羌活、女贞子、夏枯草、千里光、辛夷、豨莶草、凤尾草、铁灵仙、黄连、砂仁、荆芥、茵陈、薄荷、龙骨风用粉碎机粉碎, 过筛 (100 目), 烘干备用。

1.2.2 中药水提物及醇提物的制备

采用改进的回流提取法提取药材的活性物质: 分别称取大黄、虎杖、羌活、女贞子、夏枯草、千里光、辛夷、豨莶草、凤尾草、铁灵仙、黄连、砂仁、荆芥、茵陈、薄荷、龙骨风粉末 200 g, 用 2 000 mL 蒸馏水 80 $^{\circ}\text{C}$ 下回流提取 3 h, 过滤, 药渣再用 1 200 mL 蒸馏水回流提取 2 h, 过滤, 合并两次滤液, 旋转浓缩至浸膏状, 得到药材水提物。分别称取大黄、虎杖、羌活、女贞子、夏枯草、千里光、辛夷、豨莶草、凤尾草、铁灵仙、黄连、砂仁、荆芥、茵陈、薄荷、龙骨风粉末 200 g, 用 2 000 mL 95% 乙醇 80 $^{\circ}\text{C}$ 下回流提取 3 h, 过滤, 药渣再用 1 200 mL 95% 乙醇回流提取 2 h, 过滤, 合并两次滤液, 旋转浓缩至浸膏状, 得到药材醇提物。将中药水提物和醇提物浸膏真空冷冻干燥至粉末状

用于后续实验。称量中草药冻干粉末,水提取物用蒸馏水充分溶解,醇提取物用95%乙醇充分溶解,溶解后离心取上清液,过0.22 μm 滤膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 中药提取物对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)的测定

将-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的金黄色葡萄球菌用 TSA 平板进行活化,24 h 后挑取单菌落于含有 3 mL TSB 的试管中 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 培养过夜,分光光度计测定菌液 OD_{600 nm} 数值,并将其稀释至 OD_{600 nm} 值为 0.01 用于后续的抑菌实验。本实验采用二倍稀释法对药物提取物进行稀释的基础上运用 96 孔板细菌培养法测定细菌的 MIC^[13]:实验组为 100 μL 药物稀释液和 100 μL 菌液混匀加入 96 孔板中;阳性对照组为 100 μL 菌液加 100 μL TSB 培养基混匀后加入 96 孔板中;空白对照组为 96 孔板中只加入 200 μL TSB,各 3 个平行,加样完成后将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h,酶标仪测其 OD_{600 nm} 值,以阳性对照和空白对照为参考依据判断实验组结果。

1.2.4 金黄色葡萄球菌生物膜的测定

将-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的金黄色葡萄球菌用 TSA 平板进行活化,24 h 后挑取单菌落于含有 3 mL TSB 的试管中 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 培养过夜,分光光度计测定菌液 OD_{600 nm} 数值,并将其稀释至 OD_{600 nm} 值为 0.05 进行生物膜实验:实验组按 100 μL 各药液与 100 μL 菌液稀释液加入 96 孔板,阳性对照组按 100 μL 提取

物对应溶剂(水提取物阳性对照添加无菌水,醇提取物阳性对照添加 95% 乙醇)与 100 μL 菌液稀释液加入 96 孔板,空白对照组按 200 μL TSB 加入 96 孔板,各 3 个平行;置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,分别培养 6 h 和 12 h,测定 OD_{620 nm} 数值后弃游离菌液,用蒸馏水清洗 96 孔板 3 次去残留菌液;利用结晶紫染色法^[14]进行染色,即加入 200 μL 0.1% 结晶紫溶液染色 20 min,倒去染液并用蒸馏水反复清洗 2 次,再加入 200 μL 95% 乙醇溶解 5 min,测 OD_{540 nm},实验重复三次;最后运用软件 SigmaPlot,以 OD_{540 nm}/OD_{620 nm} 为纵坐标,时间为横坐标构建柱形图,进而分析提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的影响。

2 实验结果及分析

2.1 不同溶剂提取物对金黄色葡萄球菌的 MIC 的测定

2.1.1 水提取物对金黄色葡萄球菌生长的影响

MIC 测定结果显示 16 味中有 15 味的水提取物对金黄色葡萄球菌有不同的抑制效果,其中黄连、千里光、凤尾草、荆芥、茵陈、砂仁水提取物抑制效果最为明显,MIC 为 0.5 ~ 10 mg/mL;其次为铁灵仙、大黄、夏枯草、薄荷水提取物,MIC 为 10 ~ 30 mg/mL;虎杖、羌活、女贞子、辛夷、豨签草水提取物对金黄色葡萄球菌也有一定的抑菌活性,MIC 为 80 ~ 260 mg/mL;龙骨风水提取物对金黄色葡萄球菌没有抑菌活性(见表 1)。

表 1 中药水提取物和醇提取物对金黄色葡萄球菌的 MIC 测定结果

Table 1 MIC determination of water extract and ethanol extract of traditional Chinese medicine against *S. aureus*

中药 Chinese herb	MIC(mg/mL)		中药 Chinese herb	MIC(mg/mL)	
	水提取物 Water extrace	醇提取物 Ethanol extract		水提取物 Water extrace	醇提取物 Ethanol extract
大黄 Rhei Radix et Rhizoma(RRER)	20.77	12.07	铁灵仙 Clematidis Radix et Rhizoma(CRER)	11.70	9.50
虎杖 Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix(PCRER)	107.30	40.50	凤尾草 Pteridis Multifidae Herba(PMH)	1.11	10.10
羌活 Notopterygii Rhizoma et Radix(NRER)	130.40	11.59	龙骨风 Caulis Alsophilae(CA)	N	N
女贞子 Ligustri Lucidi Fructus(LLR)	256.15	30.63	千里光 Senecionis Scandentis Hebra(SSH)	1.95	18.40
夏枯草 Prunellae Spica(PS)	27.61	22.29	黄连 Coptidis Rhizoma(CR)	0.45	0.09
豨签草 Siegesbeckiae Herba(SH)	89.15	28.56	砂仁 Amomi Fructus(AF)	8.54	1.24
薄荷 Menthae Haplocalycis Herba(MHH)	23.86	61.73	荆芥 Schizonepetae Herba(SH)	4.38	3.96
辛夷 Magnoliae Flos(MF)	158.65	9.86	茵陈 Artemisiae Scopariae Herba(ASH)	2.75	2.25

注:"N":没有抑菌效果。

Note:"N":No antibacterial effect.

2.1.2 醇提取物对金黄色葡萄球菌生长的影响

中药醇提取物 MIC 测定结果显示,16 味中有 15 味醇提取物对金黄色葡萄球菌有不同的抑制效果,其中黄连、砂仁、茵陈、荆芥醇提取物抑制效果最为明显, MIC 为 0.1 ~ 4.0 mg/mL;其次为大黄、羌活、辛夷、铁灵仙、凤尾草、千里光醇提取物, MIC 为 9.0 ~ 20 mg/mL;虎杖、女贞子、夏枯草、豨签草、薄荷醇提取物对金黄色葡萄球菌也有一定的抑菌活性, MIC 为 20 ~ 62 mg/mL;此外,龙骨风醇提取物对金黄色葡萄球菌没有抑菌活性(见表 1)。

2.2 中药提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的影响

在不影响金黄色葡萄球菌生长的前提下,测试提取物对生物膜的影响,即根据中药提取物 MIC 数值,选取 1/2 ~ 1/8 MIC 的浓度(无抑菌作用)作为后续的生物膜实验;而没有抑菌效果的提取物选取

1/8 母液的浓度作为后续的生物膜实验。

2.2.1 水提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响

16 味中药水提取物对金黄色葡萄球菌的生物膜测定结果显示(见表 2),大黄、虎杖、羌活、女贞子、夏枯草、辛夷、龙骨风、千里光、黄连、砂仁、茵陈水提取物能明显抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成;但是豨签草、铁灵仙、凤尾草、荆芥水提取物对金黄色葡萄球菌生物膜有促进作用;其中薄荷水提取物在 6 h 时抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成,但是在 12 h 时却对又促进金黄色葡萄球菌生物膜的形成。从抑制活性上分析,大黄、虎杖、夏枯草、羌活、龙骨风水提取物对金黄色葡萄球菌生物膜抑制效果最为明显。具体工作浓度详见表 2。

表 2 中药水提取物对金黄色葡萄球菌生物膜作用的影响

Table 2 Effects of water extract of traditional Chinese medicine on the biofilm formation of *S. aureus*

中药 Chinese herb	工作浓度 Working concentration (mg/mL)	时间 Time	
		6 h	12 h
大黄 RRER	5.20	-	-
虎杖 PCRER	6.70	-	-
羌活 NRER	65.20	-	-
女贞子 LLF	64.00	-	-
夏枯草 PS	1.70	-	-
豨签草 SH	2.80	+	+
薄荷 MHH	12.00	-	+
辛夷 MF	2.50	-	-
铁灵仙 CRER	0.18	+	+
凤尾草 PMH	0.14	+	+
龙骨风 CA	0.70	-	-
千里光 SSH	0.92	-	-
黄连 CR	0.25	-	-
砂仁 AF	0.13	-	-
荆芥 SH	0.14	+	N
茵陈 ASH	1.38	N	-

注:“-”表示抑制生物膜的形成;“+”表示促进生物膜的形成;“N”表示无效果,下同。

Note:“-” means inhibition of biofilm formation;“+” means the promotion of biofilm formation;“N” means no effect, the same below.

结晶紫实验结果发现大黄、虎杖、夏枯草、千里光、砂仁、羌活、女贞子、辛夷、龙骨风和黄连水提取物对 6 h 和 12 h 的金黄色葡萄球菌生物膜的形成都有抑制效果,而且大黄、虎杖、夏枯草、龙骨风、黄连水、千里光、砂仁、羌活和辛夷水提取物展现很强的抑制效果(图 1A、1B 和图 1D)。然后豨签草、铁灵

仙、凤尾草水提取物对金黄色葡萄球菌生物膜(6 h 和 12 h 时间点)都有促进作用,其中豨签草和凤尾草促进效果明显(见图 1A、图 1D)。荆芥水提取物对 6 h 的金黄色葡萄球菌生物膜形成有促进效果,对 12 h 的金黄色葡萄球菌生物膜形成作用不明显;茵陈水提取物对 6 h 的金黄色葡萄球菌生物膜无明

显影响,对 12 h 的金黄色葡萄球菌生物膜形成有抑制作用且效果十分明显(图 1C)。

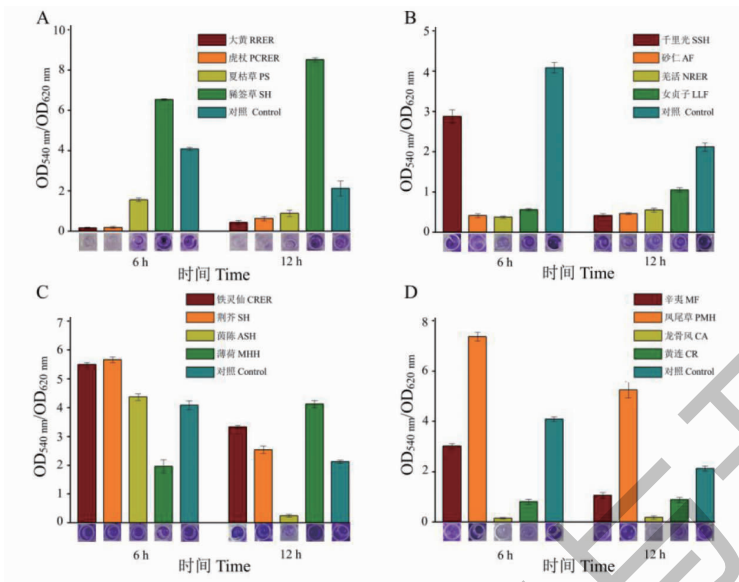


图 1 16 味中草药水提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的影响
Fig. 1 Effects of 16 herbal water extracts on biofilm formation of *S. aureus*

2.2.2 醇提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响

黄色葡萄球菌生物膜形成有抑制作用,其中抑制效果明显的为大黄、夏枯草、女贞子、铁灵仙、黄连和龙骨风醇提取物。具体工作浓度详见表 3。

16 味中药醇提取物对金黄色葡萄球菌生物膜测定结果显示(见表 3),16 味中药醇提取物均对金

表 3 中药醇提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的结果

Table 3 Effect of ethanol extract of traditional Chinese medicine on the biofilm formation of *S. aureus*

中药 Chinese herb	工作浓度 Working concentration (mg/mL)	时间 Time	
		6 h	12 h
大黄 RRER	6.03	-	-
虎杖 PCRER	20.10	N	-
羌活 NRER	5.80	-	-
女贞子 LLF	15.30	-	-
夏枯草 PS	11.30	-	-
豨签草 SH	1.80	-	-
薄荷 MHH	7.70	-	-
辛夷 MF	4.90	-	-
铁灵仙 CRER	0.59	-	-
凤尾草 PMH	0.63	-	-
龙骨风 CA	0.42	-	-
千里光 SSH	4.60	-	-
黄连 CR	0.02	-	-
砂仁 AF	2.47	-	-
荆芥 SH	0.25	N	-
茵陈 ASH	0.28	-	-

结晶紫实验结果发现大黄、夏枯草、豨莶草、千里光、砂仁、羌活、女贞子、铁灵仙、茵陈、薄荷、辛夷、凤尾草、龙骨风、黄连醇提取物对6 h和12 h的金黄色葡萄球菌生物膜形成有抑制效果,其中大黄、夏枯草、砂仁、女贞子、铁灵仙、茵陈、龙骨风、黄连醇提取物对其生物膜形成抑制效果极强,豨莶草、千里光、羌活醇、薄荷、辛夷醇提取物对金黄色葡萄球菌生物膜

形成抑制效果较明显(见图2A~2D)。虎杖醇提取物对6 h的金黄色葡萄球菌生物膜形成作用不明显,对12 h金黄色葡萄球菌生物膜形成呈抑制效果且效果明显(见图2A)。茵陈醇提取物对6 h的金黄色葡萄球菌生物膜形成作用不明显,对12 h的金黄色葡萄球菌生物膜的形成呈抑制效果且效果明显(见图2C)。

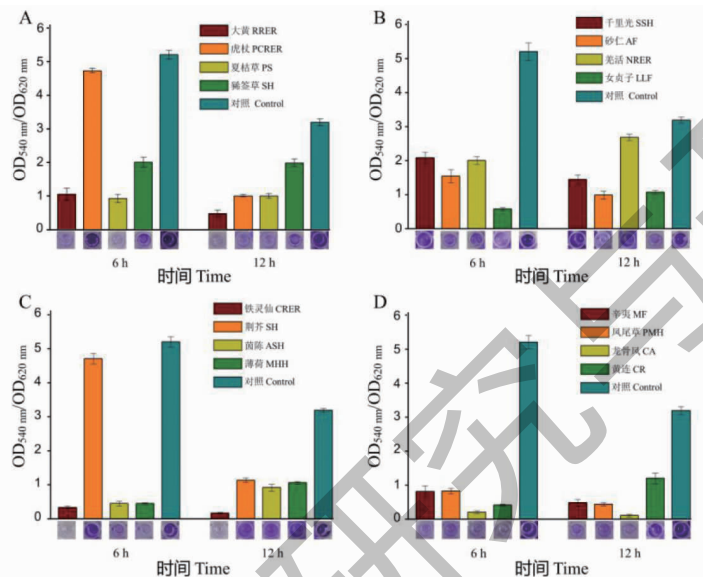


图2 16味中草药醇提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的影响

Fig. 2 Effects of 16 herbal ethanol extracts on biofilm formation of *S. aureus*

3 讨论与结论

抗生素是目前金黄色葡萄球菌感染相关病例治疗的主要策略,但金黄色葡萄球菌生物膜的形成提高了其对抗生素的抵御能力,进而降低了抗生素的效果,因此,在使用抗生素之前能抑制或者消除生物膜的形成将会大大提高抗生素的效果,这也是目前解决因生物膜形成而产生的细菌耐药性和临床上慢性感染的一个有效途径。本实验选取了16味中药材,研究其抑菌活性,结果发现大部分提取物对金黄色葡萄球菌有抑菌活性,而龙骨风对金黄色葡萄球菌无抑菌活性,这与其他研究者的实验结果一致。龙骨风为椴科植物椴的茎干,主要含有萜类、黄酮、酚酸、甾体等化学成分;目前发现其具有祛风除湿、活血散瘀和清热解毒等功效,以及抗肿瘤等多种药理活性^[15]。虽然龙骨风对金黄色葡萄球菌的抑菌效果不明显,但是在其他的生物活性功能上仍有挖掘的潜力。许多植物源提取物对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性,但是提取物的成分复杂和作用靶点不清楚等,因此使用中草药完全代替抗生素路还很

长。

金黄色葡萄球菌的耐药机制有多种,其中生物膜形成而导致的耐药性问题,已经受到越来越受关注^[16]。目前,已有研究通过化学或者生物学方法去除或者抑制生物膜的形成来控制因生物膜导致致病菌耐药的现象,特别是抗金黄色葡萄球菌生物膜的中草药的开发用于有效减弱其耐药性,特别是不同种类的黄酮类化合物有抑制金黄色葡萄球菌生长和生物膜形成的活性^[17]。本实验发现大黄、虎杖、羌活、女贞子、夏枯草、千里光、辛夷、黄连、砂仁、龙骨风、茵陈和薄荷的水提取物和醇提取物都有明显的抑制金黄色葡萄球菌生物膜的效果,对上述药材的化合物组分进行了查阅文献发现大黄、虎杖、女贞子、夏枯草、千里光、黄连、砂仁、龙骨风、茵陈和薄荷均含有黄酮类物质,但是其所含黄酮类物质与其抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成是否相关,还需要后续实验的进一步验证。此外,研究报道大黄和虎杖含大量蒽醌类物质大黄素^[18],而且 Xiang 等^[19]也证实了芦荟含蒽醌类物质大黄素,并且具有抑制金

黄色葡萄球菌生物膜形成的活性,因此推测本试验中大黄和虎杖提取物抑制金黄色葡萄球菌生物膜可能与其含蒽醌类物质大黄素有关。

目前,植物活性成分在干预细菌生物膜的应用中具有巨大的潜力,因为传统抗生素较难渗透进入细菌生物膜,而且容易产生残留和耐药性等问题,所以单独使用在控制细菌生物膜感染方面难以发挥作用,但将低残留低毒性的植物活性成分与抗生素一同使用,可以有效减少药物的用量,降低其毒副作用,并且能够提供药物渗入细菌生物膜的能力。Dey 等^[20]发现将柚皮苷分别同四环素,环丙沙星联用,能够加强这两种抗生素抑制铜绿假单胞菌生物膜形成的能力。Yan 等^[21]发现百里香酚联合苯唑西林使用可以明显增强对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制和清除效果。此外,中药提取物还能制成纳米制剂,因为传统抗生素难以渗透进入高度结构化的成熟生物膜内部,但是可以将植物活性成分制成纳米抑制剂,从而有利于药物进入细菌生物膜内部发挥药效,如纳米大黄素能抑制鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌生物膜的形成并清除其成熟生物膜,降低其生物膜相关毒力因子基因的表达^[22]。所以将植物活性成分联合其他药物一起应用于生物膜感染治疗上,或许能够得到不错的效果,具有重要的应用前景。

此外,中药的提取方法也会影响药物活性实验结果,Chu 等^[23]采用了 5 种不同提取方法对中药罗仙子活性物质进行提取,发现水提法得到的产物抑菌活性最强。Zhang 等^[24]采用水提法、醇提法和超临界 CO₂ 对北五味子有效成分进行提取,发现运用醇提取法所得药物活性物质抑菌活性明显高于其他两种溶剂提取物。Iqbal 等^[25]发现天南星的甲醇、正己烷、乙酸乙酯、正丁醇和水提取物对测试的病原菌有不同的抑菌效果,化合物成分分析发现这些不同溶剂提取物的组分种类和丰度都有着明显的差异。Zhang 等^[26]采用了 7 种不同溶剂对当归根进行了提取,并且发现不同溶剂提取物的生物活性和化合物组分有着明显的不同。这些结果说明不同的溶剂提取的植物提取物中的组分种类和丰度可能是有差异的。本实验采用水和乙醇为溶剂提取中药活性物质,结果发现铁灵仙、豨莶草、凤尾草和荆芥 4 味药物的水提物对金黄色葡萄球菌生物膜形成有促进作用,而其醇提物对金黄色葡萄球菌生物膜形成有抑制作用,推测其原因可能是两种不同的提取方法

所提取的物质组分和丰度的不同,导致了其对金黄色葡萄球菌生物膜形成作用不同。该发现给予我们一些提示,抑制生物膜的物质和促进生物膜的物质可以用不同的溶剂进行提取,如果后续开发铁灵仙、豨莶草、凤尾草和荆芥源抑制剂可以考虑用先用水对其进行提取,达到去除杂质的目的,然后再用乙醇对其进行再次提取。因此,本试验结果或许可为开发出对金黄色葡萄球菌生物膜具有抑制效果的天然药物从而减少对抗生素的使用提供参考。

本研究结果显示这 16 味中药材的提取物大部分对金黄色葡萄球菌生物膜有抑制作用,但是部分提取物作用浓度偏高,例如羌活和女贞子水提物的浓度超过 60 mg/mL,这种高作用浓度的提取物实际使用价值不高,因此后续对这些药材的开发需要综合考虑其提取物中有效活性成分的含量或者效价等因素。目前,我国对抗生物膜中药研究仍处在探索阶段,其作用成分和作用靶点的研究还不够深入,后续我们在筛选抗生物膜活性药用植物的基础上,还需要鉴定其活性化合物的成分,并且从分子生物学水平上研究其作用靶点和作用机制。

参考文献

- 1 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, 284:1318-1322.
- 2 Borriello G, Werner E, Roe F, et al. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48:2659-2664.
- 3 Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41:276-301.
- 4 Suresh MK, Biswas R, Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. *Int J Med Microbiol*, 2019, 309(1):1-12.
- 5 Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, et al. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms [J]. *Heliyon*, 2019, 5(8):e02192.
- 6 Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83:770-803.
- 7 Kim GS, Park CR, Kim JE, et al. Anti-Biofilm effects of *Torilis japonica* ethanol extracts against *Staphylococcus aureus* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2022, 32:220-227.

- 8 Shehabeldine AM, Ashour RM, Okba MM, et al. *Callistemon citrinus* bioactive metabolites as new inhibitors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112669.
- 9 Suwal N, Subba RK, Paudyal P, et al. Antimicrobial and anti-biofilm potential of *Curcuma longa* Linn. rhizome extract against biofilm producing *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2021, 67(1): 17-23.
- 10 Wang B, Wei PW, Wan S, et al. *Ginkgo biloba* exocarp extracts inhibit *S. aureus* and MRSA by disrupting biofilms and affecting gene expression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113895.
- 11 Li YH, Zhang ZQ, Wu TL, et al. Mechanisms of Chinese herb myrobalan on inhibiting formation of biofilms in *Staphylococcus aureus* [J]. *Chin J Nosocomiol (中华医院感染学杂志)*, 2019, 29: 646-649.
- 12 Liao X, Li CX, He J, et al. The inhibition of Herba Houttuyniae on *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. *J Tradit Chin Vet Med (中兽医医药杂志)*, 2022, 41(2): 26-29.
- 13 Flentie K, Spears BR, Chen F, et al. Microplate-based surface area assay for rapid phenotypic antibiotic susceptibility testing [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 237.
- 14 Nan PY, Cai ZX, Zhou SJ, et al. Comparison of bacteriostasis between water decoction and ethanol reflux extraction of 15 kinds of traditional Chinese medicine *in vitro* [J]. *Chin J Vet Med (中国兽医杂志)*, 2018, 54(11): 50-52.
- 15 Lu RM, Zhang JY, Wang X, et al. Establishment of HPLC fingerprints of *Alsophila spinulosa* and determination of five constituents [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2021, 43: 1788-1793.
- 16 Dai RQ, Lin LP, Su XY, et al. Effects of bacterial biofilm on symbiotic relationship of bacteria-insects and insect pathogenicity [J]. *Genomics Appl Biol (基因组学与应用生物学)*, 2015, 34: 862-867.
- 17 Elmasri WA, Zhu R, Peng W, et al. Multitargeted flavonoid inhibition of the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus*: a proteomic characterization [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16: 2579-2586.
- 18 Tang CL, Wei JC, Teng HL, et al. Research progress on anti-inflammatory activity of flavonoids and its mechanism [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2021, 39(4): 154-159.
- 19 Xiang H, Cao F, Ming D, et al. Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101: 6671-6681.
- 20 Dey P, Parai D, Banerjee M, et al. Naringin sensitizes the antibiofilm effect of ciprofloxacin and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm [J]. *Int J Med Microbiol*, 2020, 310(3): 151410.
- 21 Yan YZ, Yuan ZW, He JZ, et al. Effect of thymol combined with oxacillin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm [J]. *Microbiol China (微生物学通报)*, 2020, 47: 4205-4218.
- 22 Pourhajibagher M, Rahimi-esboei B, Ahmadi H, et al. The anti-biofilm capability of nano-emodin-mediated sonodynamic therapy on multi-species biofilms produced by burn wound bacterial strains [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2021, 34: 102288.
- 23 Chu FJ, Jin XB, Liu WB, et al. Effects on the vitro antibacterial activity of extraction products of Luo Xianzi (*Musca domestica*) obtained by different methods [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2014, 25: 1806-1808.
- 24 Zhang RL, Bao DD, Liu HY. Effects of extraction method on antibacterial activity of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill extracts [J]. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2010, 38: 13177-13179.
- 25 Iqbal M, Bakht J, Shafi M. Phytochemical screening and antibacterial activity of different solvent extracted samples of *Arisaema jacquemontii* [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2018, 31(1): 75-81.
- 26 Zhang L, Yu J, Xu Q, et al. Evaluation of total phenolic, flavonoid, carbohydrate contents and antioxidant activities of various solvent extracts from *Angelica amurensis* root [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35: 4084-4088.