李雨芬,姜爽,宋伍,等. 回毒银花散中各药及药物不同配比对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 63-71.
Li YF, Jiang S, Song W, et al. Effects of the various herbs and different proportions of the herbs in Huidu Yinhua powder on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 63-71.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.008

回毒银花散中各药及药物不同配比对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的作用研究

李雨芬,姜 爽,宋 伍,姜 涛,刘 畅,周豪芳,唐亚婷,魏 琳*,苏 鑫*

(长春中医药大学,长春 130117)

【摘要】 **目的** 研究《外科正宗》中回毒银花散对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的抑菌能力以及毒力因子 α-溶血素(α-hemolysin, Hla)活性和生物被膜形成的抑制作用,同时探究回毒银花散最佳配比为古方新用提供实验支撑。**方法** 通过最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)、最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)、纸片扩散法(K-B 法)分析回毒银花散及组方中各味药对 MRSA 菌株 USA300 的抑制效果,溶血实验、Hla 中和实验、Hla 寡聚实验、免疫印记(Western blot)实验验证药物以何种形式抑制毒力因子 Hla 的活性,生物被膜形成实验评价回毒银花散对生物被膜的抑制效果,最后正交实验探究回毒银花散的最佳配比。**结果** 回毒银花散抑制 MRSA 菌株,MIC_{90} 为 64 mg/mL,MBC 为 256 mg/mL,抑菌圈直径为(7.50±0.50)mm。回毒银花散还通过抑制 Hla 的释放抑制 Hla 的活性,最小有效浓度(minimum effective concentration, MEC)为 16 mg/mL,抑制生物被膜形成的 MEC 为 8 mg/mL。回毒银花散中金银花、黄芪只影响 MRSA 溶血活性以及生物被膜形成但不抑制细菌的生长,两药溶血活性 MEC 以及生物被膜形成 MEC 均为 32 mg/mL;甘草抑菌能力较强,MIC_{90} 为 8 mg/mL,生物被膜 MEC 为 1 mg/mL,在亚抑菌浓度下未表现出抑制溶血活性。最后正交实验显示,当回毒银花散中金银花、黄芪、甘草比例为 1∶2∶4 时,MIC_{90} 为 16 mg/mL,溶血活性 MEC 为 8 mg/mL,生物膜形成 MEC 为 4 mg/mL,均为 9 组中最低。**结论** 回毒银花散在亚抑菌浓度下可影响 MRSA 的溶血活性以及生物被膜形成,其中金银花、黄芪、甘草的最佳比例为 1∶2∶4。

【关键词】 金黄色葡萄球菌;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;回毒银花散;α-溶血素;生物被膜
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2024)02-0063-09

Effects of the various herbs and different proportions of the herbs in Huidu Yinhua powder on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

LI Yufen, JIANG Shuang, SONG Wu, JIANG Tao, LIU Chang, ZHOU Haofang, TANG Yating, WEI Lin*, SU Xin*
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

【Abstract】 **Objective** To study the inhibitory effect of Huidu Yinhua powder from the Orthodox Manual of External Medicine on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), virulence factor α-hemolysin (Hla) activity, and biofilm formation, and to explore the optimal ratios of Huidu Yinhua powder and provide experimental support for its

[基金项目]吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20230985KJ)。
[作者简介]李雨芬(1999—),女,硕士研究生,研究方向:方剂文献及配伍规律研究。E-mail:chengyuan56@outlook.com
[通信作者]魏琳(1984—),女,硕士,实验师,研究方向:方剂文献及配伍规律研究。E-mail:lynnw2013@sina.com
苏鑫(1975—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:方剂文献及配伍规律研究。E-mail:suxin2307@126.com
* 共同通信作者

use. **Methods** The inhibitory effects of Huidu Yinhua powder and the herbs in the formula on USA300 were analyzed by the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and disk diffusion assay (K-B method). Hemolysis, neutralization, oligomerization, and Western blot assays were used to verify in which form the drug inhibits the activity of virulence factor α-hemolysin (Hla). A biofilm assay was performed to evaluate the inhibitory effect of Huidu Yinhua powder on biofilm. Orthogonal experiments were performed to explore the optimal ratio of Huidu Yinhua powder. **Results** Huidu Yinhua powder inhibited the MRSA strain with a MIC_{90} of 64 mg/mL and an MBC of 256 mg/mL with antibacterial circle diameter of (7.50 ± 0.50) mm. Huidu Yinhua powder inhibited Hla activity by inhibiting Hla secretion. The minimum effective concentration (MEC) was 16 mg/mL, and the MEC of biofilm was 8 mg/mL. In Huidu Yinhua powder, honeysuckle and astragalus only affected the hemolytic activity of MRSA and biofilm formation without inhibiting bacterial growth. The hemolytic activity and biofilm of MEC were both 32 mg/mL. Glycyrrhiza had a strong bacterial inhibitory capacity with a MIC_{90} of 8 mg/mL and biofilm MEC of 1 mg/mL without showing inhibitory hemolytic activity at subinhibitory concentrations. The orthogonal experiment showed that, at a ratio of honeysuckle, astragalus, and glycyrrhiza in Huidu Yinhua powder of 1 : 2 : 4, the MIC_{90} was 16 mg/mL, MEC of hemolytic activity was 8 mg/mL and that of biofilm was 4 mg/mL, both of which were the lowest among the nine groups. **Conclusions** Huidu Yinhua powder affects the hemolytic activity and biofilm formation of MRSA at subinhibitory concentrations with the optimal ratio of honeysuckle, astragalus, and glycyrrhiza being 1 : 2 : 4.

【**Keywords**】 *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Huidu Yinhua powder; α-hemolysin; biofilm

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是常见的人体共生菌,同时可引起多种疾病,如皮肤软组织感染(skin and soft tissue infections,SSTI)、肺炎、菌血症等,其中 SSTI 是社区和医院环境中最常见的感染之一[1-3]。SSTI 多由化脓性病原体感染所致,*S. aureus* 是主要病原体,单纯性的皮肤软组织感染包含痈疖、毛囊炎、脓疱病、浅表性蜂窝织炎、丹毒等,复杂性 SSTI 可能会出现危及生命的坏死性筋膜炎以及严重的全身表现[4-5]。抗生素的滥用使各种耐药菌株的出现更加频繁,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)使 *S. aureus* 引起的感染变得更加凶险,同时管理复杂性 SSTI 患者的抗菌治疗也成为一项日益严峻的挑战,对医疗保健系统也造成重大负担[6]。

S. aureus 为了能更好地在宿主细胞内生存及扩散,会释放各种毒力因子达到目的,Hla 就是其中的主力军[7]。在 *S. aureus* 感染过程中,角质形成细胞的细胞膜上去整合素金属蛋白酶 10(a disintegrin and metalloproteinase 10,ADAM10)能快速聚集并识别 Hla,破坏上皮细胞之间的细胞骨架,使组织变得松散,帮助 *S. aureus* 向更深层组织进行扩散[8]。同时 Hla 快速组装为七聚体的桶状结构,在细胞膜上完成穿孔,为 *S. aureus* 进入细胞提供条件[9]。进入细胞内的 *S. aureus* 产生的 Hla 在线粒体表面穿孔,线粒体应激导致活性氧大量释放,通过坏死、凋亡或焦亡等多种途径引起细胞死亡[10-11]。除此之外,生物膜在感染过程中也起到非常重要的作用,相当于在细菌表面覆盖一层厚防护层,增加了细菌对抗生素药物的耐药性,并且致密的生物膜可以有效阻挡抗生素向深层渗透,增加感染后复发概率[12-13]。

回毒银花散源自《外科正宗 · 卷二》,由金银花、黄芪、甘草三味药以 2 : 4 : 1 的比例组合而成,主治为"治脑疽及诸发阴疮不起"[14]。脑疽是发于脑后项部的有头疽,阴疮为阴性溃疡,主要表现为患处漫肿无头,皮色不变,皮温不高。根据临床表现,脑疽和阴疮都属于化脓性病原体引起的感染。研究回毒银花散的最佳药物配比,及其对 MRSA 毒力因子 Hla 和生物膜的抑制作用,为新药开发提供实验依据。

1　材料和方法

1.1　菌株

MRSA 菌株 USA300(ATCC BAA 1717)购自美国模式培养物集存库。

1.2　主要试剂与仪器

中药免煎颗粒金银花(2201416101)、黄芪(231087101)、甘草(2208135101)购自江阴天江药业有限公司,将中药免煎颗粒用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)溶解为 1 g/mL 溶液,随

后按原方比例将金银花、黄芪、甘草以 2∶4∶1 混合配制回毒银花散溶液，置于 4 ℃保存。除正交实验，其余回毒银花散中金银花、黄芪、甘草的比例均为 2∶4∶1。万古霉素（V871983, 250 mg）购自上海麦克林科技有限公司；胰蛋白胨大豆肉汤（tryptic soy broth, TSB, HB4114）、阳离子调节肉汤（ationadjusted mueller-hinton broth, CAMHB, HB6231-1）及胰蛋白胨大豆琼脂（tryptose soya agar, TSA, HB0177）购自青岛海博生物技术有限公司；无菌抗凝兔血（20230610）购自北京平睿生物科技有限公司；山羊抗兔（A0208）、结晶紫染色剂（C0121）、DMSO（ST038）、脱氧胆酸钠（ST2049）购自上海碧云天生物技术有限公司。

紫外可见分光光度计（T6，北京普析通用仪器有限责任公司）；酶标仪（A51119700C, Thermo Scientific）；振荡培养箱（KT-2，常州市中贝仪器有限公司）；低温离心机（75002554, Thermo Scientific）；生化培养箱（LC-SPX-70BE，上海力辰仪器科技有限公司）；GraphPad Prism 8.0 统计软件（GraphPad Software San Diego, CA，美国）。

1.3　实验方法

1.3.1　最低抑菌浓度（minimum inhibitory concentration, MIC）、最低杀菌浓度（minimum bactericidal concentration, MBC）

过夜培养的 USA300 以 1∶100 的比例传代至 CAMHB 肉汤中培养，当 A_{600} 为 0.8 时，稀释菌液至最终浓度为 10^6 CFU/mL。在 96 孔板中加入 100 μL 菌液以及 1~512 mg/mL 浓度梯度中药颗粒溶液，置于恒温培养箱中（37 ℃，24 h），然后酶标仪测量 A_{600} 值。最后将加药培养的菌液均匀铺在 TSA 琼脂板中，恒温培养（37 ℃，24 h）观察是否有菌落生成。

1.3.2　时间-生长曲线

USA300 菌液以 1∶100 传代至 TSB 培养基，当 A_{600} 为 0.3 时，转移至新试管后加入中药颗粒溶液，取出 100 μL 点入 96 孔板中，用酶标仪测量 600 nm 吸光度值，记录 0 h 的数据。此后每 1 h 取 100 μL 测量 1 次，直至 6 h 后，改为每 2 h 1 次。

1.3.3　K-B 法

用棉签将 USA300 菌液均匀平铺在 TSA 琼脂板中，取中药颗粒溶液（1 g/mL）和万古霉素（2 mg/mL）20 μL 完全浸润 6 mm 直径的纸片后，贴入含菌的 TSA 培养板中，置于 37 ℃恒温培养箱中培养 16 h，用直尺测量抑菌圈直径。

1.3.4　溶血实验

将含有中药颗粒溶液的 USA300 菌液，培养至 A_{600} 为 2.5 时，离心（5000 r/min，5 min）取 100 μL 上清液，加入装有 850 μL 磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffered saline, PBS）的 1.5 mL EP 管中，取 940 μL PBS 缓冲液和 10 μL 的 Triton-X 100 为阳性对照组，最后取 50 μL 无菌新鲜兔血混匀后，放置于 37 ℃恒温培养箱中培养 30 min，低温离心（4 ℃，5000 r/min，3 min），用酶标仪测量 A_{543} 值。

1.3.5　Hla 中和实验

将 A_{600} 为 2.5 的 USA300 菌液离心（5000 r/min，5 min），取 100 μL 上清，加至含有 PBS 缓冲液与中药颗粒溶液的混合液中，保持体积为 950 μL。最后加入 50 μL 无菌新鲜兔血，剩余步骤与溶血试验一致。

1.3.6　Westem blot 实验

将蛋白电转至聚偏二氟乙烯膜后，用 2.5% 脱脂奶粉封闭 2 h，转移至 Hla 一抗（1∶5000）中 4 ℃过夜孵育，TBS/T 清洗 5 次（130 r/min，5 min），加入含有辣根过氧化物酶（HRP）标记山羊抗兔 IgG 的二抗（1∶1000）孵育 2 h，显影结果用 Image J 软件分析。

1.3.7　Hla 蛋白寡聚实验

在 500 μL 的 Ep 管中加入 5 mmol 脱氧胆酸盐溶液 100 μL，加入 Hla 蛋白至最终浓度为 0.5 mg/mL，最后加入中药颗粒溶液混匀，22 ℃孵育 25 min。与 5×非还原性蛋白上样缓冲液以 4∶1 的比例混合后金属浴（55 ℃，10 min）。电泳结束后，倒入考马斯亮蓝染色剂中，最后结果用 Image J 分析 Hla 七聚体与单体的比值。

1.3.8　生物被膜形成实验

向酶标板中点入 A_{600} 为 0.3 的 USA300 菌液 100 μL，再加中药颗粒溶液，放入 37 ℃恒温箱中培养 24 h。用 PBS 缓冲液清洗浮游细菌，结晶紫染色 20 min，再次使用 PBS 缓冲液洗脱未结合结晶紫，最后无水乙醇溶解结晶紫，酶标仪测量 595 nm 处吸光度值。

1.3.9　正交实验

将回毒银花散中金银花、黄芪、甘草作为影响回毒银花散效果的 3 个因素，以原方比例 2∶4∶1 为基础，每个因素安排 1、2、4 三个比例水平。用 SPSS 13.0（SPSS Chicago, IL，美国）进行随机分组，

产生 9 组数据进行分析。

1.4　统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件和 SPSS 进行统计学分析。每组实验均重复 3 次,用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)展示实验数据,呈现正态分布的独立样本采用 t 检验,多组均数采用单因素方差分析,当 $P<0.05$ 时认为有显著性差异。

2　结果

2.1　回毒银花散对 MRSA 的抑菌检测

为了探究回毒银花散对 MRSA 菌株的影响,用微孔板法测量 MIC 和 MBC,结果显示回毒银花散的 MIC_{90} 为 64 mg/mL,MBC 为 256 mg/mL。K-B 法测试回毒银花散抑菌能力,用万古霉素作为对照组,显示回毒银花散的抑菌圈为(7.50±0.50)mm。

2.2　回毒银花散对 MRSA 溶血活性的影响

用无菌新鲜兔血以 MIC_{90} 为最大浓度进行梯度溶血实验,共设置 5 个梯度,测试回毒银花散抑制溶血的能力,结果显示回毒银花散在亚抑菌浓度 16 mg/mL 的情况下依旧抑制 MRSA 的溶血活性。见表 1。

2.3　回毒银花散对 MRSA 生物被膜形成的影响

通过结晶紫染色剂对生物被膜进行染色,能明显观察到回毒银花散以剂量依赖性的方式抑制 MRSA 生物被膜的形成,64 mg/mL 时几乎没有生物被膜的覆盖,随药物浓度降低,吸光度值逐渐增高呈剂量依赖性,8 mg/mL 时仍能抑制生物被膜的形成,4 mg/mL 吸光度值与空白组相差不大。见表 2。

2.4　亚抑菌浓度的回毒银花散的时间-生长曲线

从 MIC 结果可知,在 16 mg/mL 浓度下回毒银花散并不抑制细菌的生长,但其仍然可以抑制 MRSA 的溶血活性以及生物被膜的形成。为了进一步确定在 16 mg/mL 浓度下回毒银花散是否有抑菌效果,测定了回毒银花散的时间-生长曲线,结果显示加入 16 mg/mL 浓度的回毒银花散对 MRSA 菌株的生长没有明显影响。见图 1。

2.5　回毒银花散对 Hla 蛋白的影响

Hla 中和实验显示回毒银花散在 64 mg/mL 以及 32 mg/mL 浓度对 Hla 的溶血活性有影响,提示在一定浓度下回毒银花散直接中和 Hla 的溶血活性。随后 Hla 蛋白寡聚实验,利用脱氧胆酸盐促使纯化的 Hla 蛋白低聚成具有活性的七聚体形态,分析结果显示 64 mg/mL 以下浓度不影响 Hla 七聚体的形成。最后测试回毒银花散是否抑制 Hla 的分泌,取含有不同浓度药物的 MRSA 菌液上清,制作成蛋白样品进行 Westem blot 实验,结果显示回毒银花散在 4 mg/mL 浓度下显著减少 *S. aureus* 中 Hla 释放量。见表 3。

2.6　回毒银花散中各药对 MRSA 的抑菌检测

为了探究回毒银花散中各味药物对 MRSA 菌株的抑制效果,首先分别对金银花、黄芪、甘草三味药进行了 MIC、MBC 测定,结果可知金银花的 MIC_{90} 为 256 mg/mL,MBC>512 mg/mL;黄芪的 MIC_{90} 为

表 1　不同浓度回毒银花散对 MRSA 溶血活性影响($n=3$)
Table 1　Effect of different concentrations of Huidu Yinhua powder on the hemolytic activity of MRSA

	药物浓度/(mg/mL) Herb concentration	溶血活性/% Hemolytic activity
回毒银花散 Huidu Yinhua powder	0	100.00±11.41
	4	105.75±11.33
	8	91.88±13.08
	16	4.04±0.81***
	32	3.11±0.53***
	64	3.43±0.80***

注:与 0 mg/mL 组比较, *** $P<0.001$。
Note. Compared with the 0 mg/mL group, *** $P<0.001$.

表 2　不同浓度回毒银花散对 MRSA 生物被膜形成影响($n=3$)
Table 2　Effect of Huidu Yinhua powder with different concentration on MRSA biofilm formation

	药物浓度/(mg/mL) Herb concentration	生物被膜形成(A_{595}) Biofilm formation(A_{595})
回毒银花散 Huidu Yinhua powder	0	2.03±0.17
	4	1.78±0.12
	8	1.49±0.23*
	16	1.45±0.14**
	32	1.07±0.12***
	64	0.67±0.13***

注:与 0 mg/mL 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$。
Note. Compared with the 0 mg/mL group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

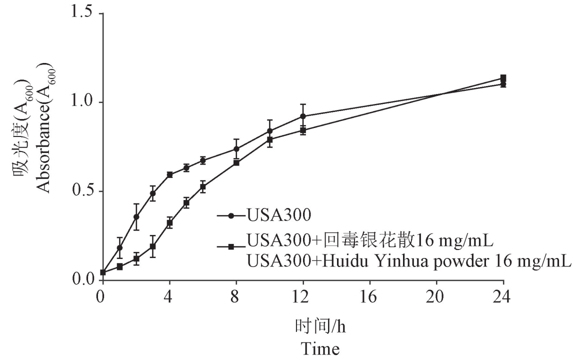


图 1　回毒银花散时间-生长曲线
Figure 1　Time-growth curves for Huidu Yinhua powder

512 mg/mL，MBC>512 mg/mL；两者抑菌能力较弱。甘草的 MIC_{90} 为 8 mg/mL，MBC 为 64 mg/mL，显示强抑菌作用。随后用 K-B 法进一步测量各味药物对 MRSA 的敏感程度，结果显示金银花和黄芪对 USA300 均不敏感，甘草抑菌圈大小为（11.83±0.29）mm，属于中度敏感。根据上述 MIC 结果，我们选用不影响细菌生长的适宜药物浓度为最高梯度进行溶血及生物被膜实验。为进一步验证药物在设定的最高梯度不影响细菌的生长，又测定了 3 味药物的时间-生长曲线，结果显示金银花、黄芪在 64 mg/mL，甘草在 2 mg/mL 浓度下均不影响 MRSA 的生长。见图 2，表 4。

2.7 回毒银花散中各药对 MRSA 溶血活性及 Hla 蛋白的影响

溶血结果显示金银花和黄芪均在 32 mg/mL 以上浓度显著抑制 USA300 的溶血活性，甘草在亚抑菌浓度下未表现出明显对溶血活性的抑制效果。与 2.5 思路一致，首先针对金银花和黄芪进行 Hla 中和实验，观察两味药是否中和 Hla 毒性的形式抑制 Hla 的穿孔活性，结果显示金银花在 8 mg/mL 即表现出对 Hla 蛋白的抑制作用，同时黄芪在 64 mg/mL 及 32 mg/mL 也有相应作用。随后又进行 Hla 寡聚实验，结果显示黄芪和金银花则未表现对 Hla 七聚体形成的抑制作用。最后 Western blot 实验再一次验证金银花和黄芪也主要通过抑制 Hla 的分泌来降低 MRSA 的溶血活性，据统计结果可观察到 4 mg/mL 浓度的金银花和黄芪均能使培养基中由 USA300 释放的 Hla 蛋白大幅度减少。见表 5，图 3。

表 3　不同浓度的回毒银花散对 Hla 蛋白影响（$n=3$）

Table 3　Effects of different concentrations of Huidu Yinhua powder on Hla proteins

	药物浓度/(mg/mL) Herb concentration	Hla 中和实验/% Hla neutralization assay	Hla 寡聚实验（七聚体/Hla） Hla oligomerization assay (Heptamer/Hla)	Hla 蛋白免疫印记实验/% Hla Western blot
回毒银花散 Huidu Yinhua powder	0	100.02±10.53	1.21±0.12	100.00±6.13
	4	96.78±10.03	1.10±0.27	65.47±13.75 **
	8	91.91±9.54	1.00±0.05	25.68±7.04 ***
	16	81.36±8.15	0.89±0.05	10.60±3.11 ***
	32	60.65±6.73 **	1.01±0.13	6.02±0.83 ***
	64	49.96±4.68 ***	1.18±0.21	6.00±0.77 ***

注：与 0 mg/mL 组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

Note. Compared with the 0 mg/mL group, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

表 4　回毒银花散中各味药 MIC、MBC 和抑菌能力

Table 4　MIC, MBC and bacteriostatic ability of each flavor of the herbs in Huidu Yinhua powder

组别 Groups	MIC/(mg/mL)	MBC/(mg/mL)	抑菌圈/mm Sphere of inhibition	敏感程度 Sensitivity level
金银花 Honeysuckle	256	>512	/	不敏感 Insensitive
黄芪 Astragalus	512	>512	/	不敏感 Insensitive
甘草 Glycyrrhiza	8	64	11.83±0.29	中度敏感 Moderately sensitive

注：敏感度标准：抑菌圈直径>20 mm 为极度敏感，15.1～20 mm 为高度敏感，10～15 mm 为中度敏感，<10 mm 为不敏感。

Note. Sensitivity criteria, Inhibition circle diameter >20 mm is extremely sensitive, 15.1～20 mm is highly sensitive, 10～15 mm is moderately sensitive, <10 mm is insensitive.

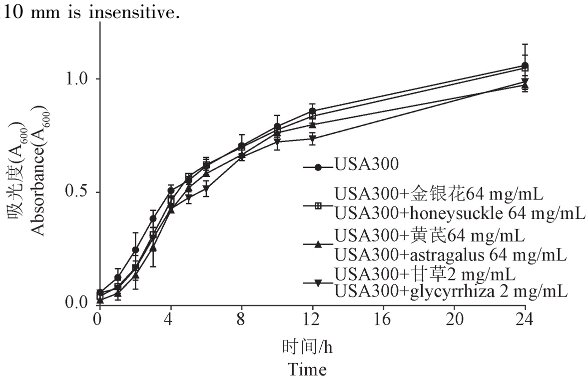


图 2　回毒银花散中各味药的时间-生长曲线

Figure 2　Time-growth curves of the individual herbs in Huidu Yinhua powder

2.8 回毒银花散中各药对生物被膜形成的影响

生物被膜实验观察回毒银花散中单味药物对生物被膜形成的抑制作用，结果显示金银花对生物膜的最小抑制浓度为 32 mg/mL，黄芪为 16 mg/mL，甘草则能在更小的浓度 1 mg/mL 显示出对生物膜形成的抑制作用。见图 4。

2.9　回毒银花散中各药的最佳配比

由上述的所有实验,我们可以明显观察到甘草在回毒银花散中显示出强抑菌能力,三味药合用使在亚抑菌浓度下回毒银花散对 MRSA 菌株还表现出较强的抑制溶血以及生物膜形成的能力。如表 6 所示,原方中金银花、黄芪、甘草为2∶4∶1,为了测

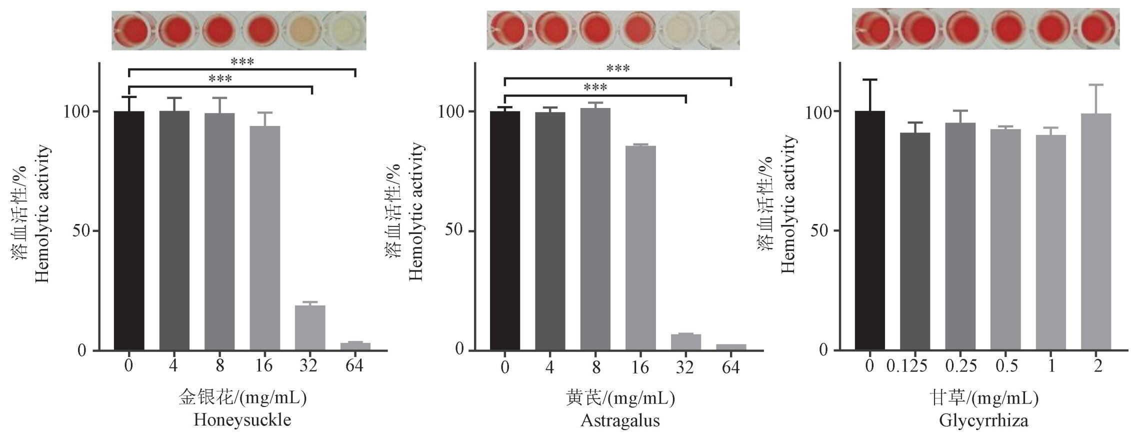
表 5　金银花、黄芪对 Hla 蛋白的影响($n=3$)

Table 5　Effect of honeysuckle and astragalus on Hla proteins

药物浓度/(mg/mL) Herb concentration	Hla 中和实验/% Hla neutralization assay		Hla 寡聚实验(七聚体/Hla 单体) Hla oligomerization assay (Heptamer/Hla monomer)		Hla 蛋白免疫印记实验/% Hla Western blot	
	金银花 Honeysuckle	黄芪 Astragalus	金银花 Honeysuckle	黄芪 Astragalus	金银花 Honeysuckle	黄芪 Astragalus
0	100.00±9.64	100.00±1.44	0.99±0.28	1.43±0.85	100.00±3.59	100.00±1.31
4	88.09±3.62	98.80±1.44	0.94±0.21	1.44±0.49	43.46±8.50***	20.55±0.73***
8	81.33±9.38*	98.13±4.66	0.83±0.07	1.05±0.13	27.00±9.62***	15.74±0.18***
16	65.68±2.37***	98.28±1.43	0.79±0.11	0.74±0.05	10.59±3.01***	9.38±0.95***
32	61.30±3.10***	76.80±3.74***	0.90±0.09	0.64±0.06	5.82±0.93***	8.10±1.27***
64	20.56±1.42***	59.39±3.81***	0.94±0.20	0.84±0.05	6.19±1.23***	7.25±0.46***

注:与 0 mg/mL 组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$。

Note. Compared with the 0 mg/mL group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

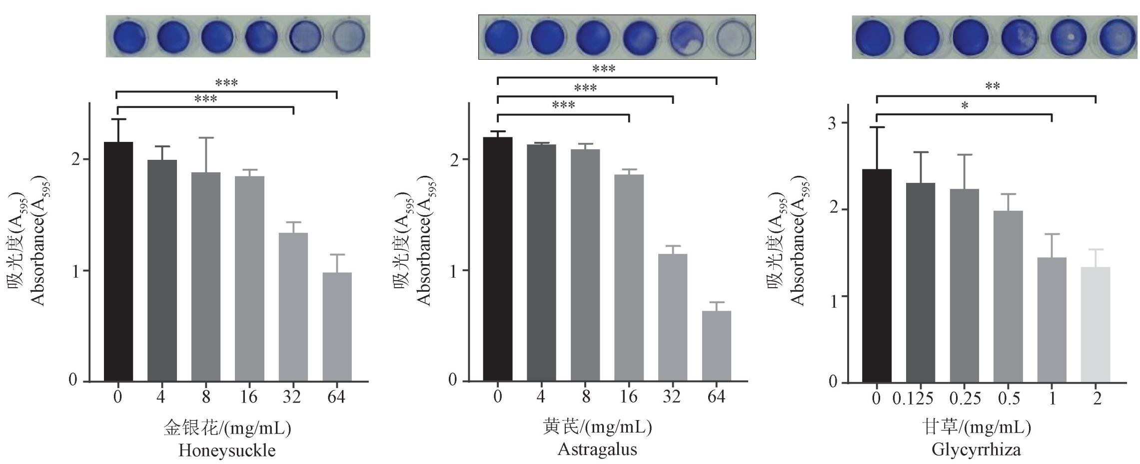


注:与 0 mg/mL 组比较, *** $P<0.001$。

图 3　回毒银花散中各味药对 MRSA 溶血活性影响($n=3$)

Note. Compared with the 0 mg/mL group, *** $P<0.001$.

Figure 3　Effects of various flavors of herbs on the hemolytic activity of MRSA in Huidu Yinhua powder



注:与 0 mg/mL 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$。

图 4　回毒银花散中各药对生物被膜形成的影响($n=3$)

Note. Compared with the 0 mg/mL group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4　Effects of the flavors in Huidu Yinhua powder on the formation of MRSA biofilms

表 6　回毒银花散正交实验结果($n=3$)
Table 6　Results of orthogonal assay on Huidu Yinhua powder

序号 Serial number	药物比例 (金银花:黄芪:甘草) Herb ratio (honeysuckle:astragalus:glycyrrhiza)	抑菌圈/mm Sphere of inhibition	MIC_{90}/(mg/mL)	溶血 MEC/(mg/mL) Hemolysis MEC	生物被膜 MEC/(mg/mL) Biofilm MEC
1	4:4:1	6.33±0.47	256	32	16
2	1:2:4	10.17±0.26 ***	16	8	4
3	4:1:4	9.33±0.26 ***	32	16	8
4	2:4:4	9.33±0.47 ***	32	16	4
5	4:2:2	8.00±0.82	64	32	8
6	2:2:1	7.33±0.47	64	32	4
7	2:1:2	9.67±0.47 ***	32	16	8
8	1:1:1	8.33±0.62	32	16	4
9	2:4:1	7.00±0.00	64	16	8

注:与第 9 组比较, *** $P<0.001$。敏感度标准:抑菌圈直径>20 mm 为极度敏感,15.1~20 mm 为高度敏感,10~15 mm 为中度敏感,<10 mm 为不敏感。
Note. Compared with the group 9, *** $P<0.001$. Sensitivity criteria, Inhibition circle diameter >20 mm is extremely sensitive, 15.1~20 mm is highly sensitive, 10~15 mm is moderately sensitive, <10 mm is insensitive.

试方中药物最佳比例,设计产生了 9 种组合形式的正交表。分别对 9 组药物组合进行 MIC 和抑菌圈测量,结果显示有 5 组数据的 MIC_{90} 较原方 64 mg/mL 不同程度下降,4 组抑菌圈大小较原方显著性增大。分析 9 组数据可知当甘草在方中占比越高则回毒银花散的抑菌能力越强,其中金银花、黄芪、甘草的比例为 1∶2∶4 时,MIC_{90} 值在 9 组中最小,为 16 mg/mL,并且抑菌圈尺寸达到(10.17±0.26)mm,较原方有显著升高,在 9 组药物配比中显示出抑菌能力最强。在此比例下,药物浓度为 8 mg/mL 即显示出对 *S. aureus* 溶血活性的良好抑制作用,4 mg/mL 时仍对生物被膜的形成有抑制效果,均能在亚抑菌浓度下展现对 *S. aureus* 毒力的抑制作用,并且较原方所需药物浓度更低,是目前最佳药物配比。

3　讨论

随着耐药菌株的不断发展,SSTI 患者的抗菌治疗也是临床治疗的棘手问题。针对浅表性的 SSTI 如痈疖、毛囊炎等,直接进行引流,大多治愈后复发频率较高,在治疗后仍需要口服抗生素防止复发;较为严重的 SSTI 则不仅需要引流,还需要配合内服、外用抗生素,防止进一步感染以及并发症的出现,目前较为推荐万古霉素为首选药物,其他还有克林霉素、利奈唑胺、达托霉素、替考拉宁等[15-17]。抗生素的大量使用,为细菌的耐药性的发展提供了良好的温床,同时也破坏了身体的共生菌群[17-19]。共生微生物群的存在,可以与病原菌争夺营养物和粘附位点,在这种竞争中,共生细菌能干扰潜在病原体的粘附和发病机制,从而保护宿主[20-22]。

本研究结果表明,高浓度的回毒银花散对 MRSA 有显著抑制作用,亚抑菌浓度的回毒银花散可以通过抑制毒力因子 Hla 以及生物被膜的形成减弱 MRSA 毒性。根据 MIC、时间-生长曲线数据可知亚抑菌浓度的回毒银花散对 MRSA 菌株生长产生的抑制作用微乎其微,在一定程度上减缓 *S. aureus* 的生存压力,同时溶血与生物被膜形成实验的结果显示,在不抑制细菌生长情况下,回毒银花散依旧能抑制 MRSA 的溶血活性以及生物被膜的生成,达到减毒的目的。Hla 活性被抑制时 *S. aureus* 难以穿过细胞膜进入到宿主细胞体内进行免疫逃避;同时减少细胞死亡,炎症因子水平大量减轻;减少细胞骨架的破坏,使 *S. aureus* 感染停留在表皮层,减少向下渗透。此外,阻碍生物被膜的形成,使药物能向更深层渗透,深层细菌无处可逃,减少清除不彻底导致的疾病复发。

对回毒银花散进行拆解处理后,发现方中甘草的抑菌能力最强,在亚抑菌浓度下虽未表现出对溶血活性的抑制作用,但对生物被膜的形成有抑制作用。金银花和黄芪均对 *S. aureus* 不敏感,但是在亚抑菌浓度下无论是对 *S. aureus* 的溶血活性还是生物被膜的形成都有明显的抑制效果。三药配合使用,金银花和黄芪缓和甘草的抑菌能力,使整方在亚抑菌浓度下依旧通过抑制 *S. aureus* 毒力因子的释放以及破坏毒力因子的活性结构等多种形式减轻 *S. aureus* 侵袭能力。在治疗有效的前提下,达到降低 *S. aureus* 的生存压力的目的,减缓其形成耐药的进程。最后正交实验对全方比例进行调整后发现,甘草在方中的占比越高会显著增加整方对 *S.*

aureus 的敏感性,但单独使用甘草很难在亚抑菌浓度下有所突破。因此适当调整金银花、黄芪、甘草在整方中的比例,扩大甘草用量,将三者比例调整为 1∶2∶4,在大幅度降低整方抑菌浓度的基础上,还能保留在亚抑菌浓度下对 *S. aureus* 溶血活性以及生物被膜形成的抑制作用。并且无论是抑菌浓度或是对 *S. aureus* 溶血活性以及阻碍生物被膜形成的 MEC 均为 9 组中最低,是目前较为理想的药物比例。

回毒银花散既可治疗火热毒邪所引起的脑疽,也可治疗正气不足,邪毒内陷所导致的阴疮。方中金银花性味甘寒,有清热解毒,消炎退肿之用,《本草求真》言:“能治恶疮、痈疽,为外科治毒通行要剂”,近代研究也证明金银花的提取物可以治疗脓毒症[23-24]。黄芪性甘温,托毒排脓,敛疮生肌,目前黄芪为主药的方剂也广泛用于糖尿病足的治疗中,效果甚佳[25-27]。甘草性甘平,可清热解毒,缓急止痛,现代研究甘草中的有效成分对 *S. aureus* 有很强的抑制作用[28-29]。三药配合使用,共奏清热解毒,托毒生肌之功,但三药占比不同则功效偏向不同,探寻不同比例在体内达到的最佳治疗效果将是进一步研究重点。

目前 *S. aureus* 引起 SSTI 的治疗方式仍然是引流加抗生素的组合,但抗生素引起的细菌耐药是临床难题。近年来,抗毒力策略又一次被重视,因其一方面可以抑制细菌毒力,使杀伤力大大降低;另一方面药物不直接杀死细菌,缓解细菌的生存压力,减少耐药菌株的产生。本实验在体外测试回毒银花散在亚抑菌浓度下对 MRSA 毒力靶点 Hla 和生物被膜形成的抑制作用,探究方中各药的具体功效以及药物最佳配比,为回毒银花散投入临床使用提供进一步实验支撑。

参考文献:

[1] STRYJEWSKI M E, CHAMBERS H F. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(Suppl 5): S368-S377.

[2] SELB R, ALBERT-BRAUN S, WELTZIEN A, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from children at hospital admission: experiences from a hospital in a German metropolitan area [J]. Pediatr Infect Dis J, 2022, 41(9): 720-727.

[3] ZHONG J, WEI M, YANG C, et al. Molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and clinical characteristics of different sites of infection [J]. Infect Drug Resist, 2023, 16: 1485-1497.

[4] ESPOSITO S, NOVIELLO S, LEONE S. Epidemiology and microbiology of skin and soft tissue infections [J]. Curr Opin Infect Dis, 2016, 29(2): 109-115.

[5] MILLER L G, PERDREAU-REMINGTON F, RIEG G, et al. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles [J]. N Engl J Med, 2005, 352(14): 1445-1453.

[6] LIVORSI D J, NAIR R, LUND B C, et al. MRSA prevalence and hospital-level antibiotic use: a retrospective study across 122 acute-care hospitals [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2021, 42(3): 353-355.

[7] PULIA M S, ANDERSON J, YE Z, et al. Expression of staphylococcal virulence genes *in situ* in human skin and soft tissue infections [J]. Antibiotics, 2022, 11(4): 527.

[8] MARETZKY T, REISS K, LUDWIG A, et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(26): 9182-9187.

[9] WILKE G A, BUBECK WARDENBURG J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α-hemolysin-mediated cellular injury [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(30): 13473-13478.

[10] ESSMANN F, BANTEL H, TOTZKE G, et al. *Staphylococcus aureus* α-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation [J]. Cell Death Differ, 2003, 10(11): 1260-1272.

[11] COHEN T S, BOLAND M L, BOLAND B B, et al. S. aureus evades macrophage killing through NLRP3-dependent effects on mitochondrial trafficking [J]. Cell Rep, 2018, 22(9): 2431-2441.

[12] SCHILCHER K, HORSWILL A R. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2020, 84(3): e00026-e00019.

[13] RÖMLING U, BALSALOBRE C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies [J]. J Intern Med, 2012, 272(6): 541-561.

[14] (明)陈实功. 外科正宗 [M]. 上海: 上海科学技术出版社,1989.
CHEN S G. Surgical authenticity [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers,1989.

[15] SARTELLI M, GUIRAO X, HARDCASTLE T C, et al. 2018 WSES/SIS-E consensus conference: recommendations for the management of skin and soft-tissue infections [J]. World J Emerg Surg, 2018, 13: 58.

[16] UHLEMANN A C, DORDEL J, KNOX J R, et al. Molecular tracing of the emergence, diversification, and transmission of S. aureus sequence type 8 in a New York community [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(18): 6738-6743.

[17] TACCONELLI E. Antimicrobial use: risk driver of multidrug resistant microorganisms in healthcare settings [J]. Curr Opin

Infect Dis, 2009, 22(4): 352-358.

[18] NAKASE K, KOIZUMI J, FUKUMOTO S, et al. Increased prevalence of minocycline-resistant *Staphylococcus epidermidis* with *tet*(M) by tetracycline use for acne treatment [J]. Microb Drug Resist, 2022, 28(8): 861-866.

[19] FRITZ S A, WYLIE T N, GULA H, et al. Longitudinal dynamics of skin bacterial communities in the context of *Staphylococcus aureus* decolonization [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0267221.

[20] CREECH C B, AL-ZUBEIDI D N, FRITZ S A. Prevention of recurrent staphylococcal skin infections [J]. Infect Dis Clin North Am, 2015, 29(3): 429-464.

[21] CELLA M A, COULSON T, MACEACHERN S, et al. Probiotic disruption of quorum sensing reduces virulence and increases cefoxitin sensitivity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 4373.

[22] SALGAONKAR N, KADAMKODE V, KUMARAN S, et al. Glycerol fermentation by skin bacteria generates lactic acid and upregulates the expression levels of genes associated with the skin barrier function [J]. Exp Dermatol, 2022, 31(9): 1364-1372.

[23] (清)黄宫绣. 本草求真[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987.
HUANG G X. Materia medica [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1987.

[24] 李文举, 罗福龙, 王凤忠, 等. 金银花水提物改善脓毒血症的物质基础研究[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 79-89.
LI W J, LUO F L, WANG F Z, et al. Exploring the mechanism of *Lonicerae* japonicae flos water extract in the treatment of sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 79-89.

[25] 张臻, 阙华发. 黄芪多糖对糖尿病溃疡大鼠炎症期相关因素的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(5): 616-623.
ZHANG Z, QUE H F. Effect of *Astragalus* polysaccharides on the factors related to inflammation stage in diabetic ulcer rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2022, 33(5): 616-623.

[26] 余玲, 董瑞鸿, 宋秋艳, 等. 黄芪桂枝汤治疗糖尿病足疗效及对患者周围神经感觉阈值、微炎症状态的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33(1): 82-87.
YU L, DONG R H, SONG Q Y, et al. The clinical efficacy of huangqiguizhi decoction and effect on peripheral nerve sensory threshold value and inflammatory state in patients with diabetic foot [J]. Chin J Dermatovenereol, 2019, 33(1): 82-87.

[27] 刁元元, 李玉梅, 李晓文, 等. 黄芪抗糖尿病并发症的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 123-128.
DIAO Y Y, LI Y M, LI X W, et al. Review of Astragali radix for treating diabetic complications [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 123-128.

[28] XU Z, XU Z, GU J, et al. *In situ* formation of ferrous sulfide in glycyrrhizic acid hydrogels to promote healing of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*-infected diabetic wounds [J]. J Colloid Interface Sci, 2023, 650(Pt B): 1918-1929.

[29] 张鹰, 熊鑫, 马浩然, 等. 甘草油的 HPLC-MS/MS 法分析及抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 861-864.
ZHANG Y, XIONG X, MA H R, et al. Analysis of *Glycyrrhiza uralensis* fisch oil by HPLC-MS/MS and study on its bacteriostasis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(4): 861-864.

〔收稿日期〕2023-09-04