

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.23.006

4 种抗菌洗液对金黄色葡萄球菌的抑制作用*

黄少隆, 张翠惠, 黄冬枚, 郭文婷, 郑庆茹, 周 湧[△]

广东省东莞市滨海湾中心医院检验科, 广东东莞 523903

摘要:目的 探讨 4 种不同抗菌洗液对金黄色葡萄球菌生长及毒力表达的影响, 分析不同成分的洗液对金黄色葡萄球菌抑制原理。**方法** 通过微量肉汤稀释法测定 4 种抗菌洗液最低抑菌浓度, 用紫外吸收光谱法检测细菌细胞质膜的完整性, 最后采用肿瘤坏死因子(TNF)- α 检测试剂盒(ELISA)测定洗液作用后的金黄色葡萄球菌对人单核细胞分泌 TNF- α 水平的影响。**结果** B 洗液、D 洗液的最低抑菌浓度为 6.20 mg/mL。A 洗液、C 洗液的最低抑菌浓度为 3.10 mg/mL, 抑制效果分别为 A>C>B>D, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 4 种抗菌洗液具有一定的抑菌效果, 其中 C 抗菌洗液具有良好的抗菌效果, 应用广泛, 价格适中, 适宜推广。

关键词: 抗菌洗液; 金黄色葡萄球菌; 抑菌作用**中图分类号:** R446.5**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2021)23-3380-04Inhibition of four kinds of antibacterial lotions on *Staphylococcus aureus**HUANG Shaolong, ZHANG Cuihui, HUANG Dongmei, GUO Wenting, ZHENG Qingru, ZHOU Yong[△]Department of Clinical Laboratory, Binhaiwan Central Hospital of
Dongguan, Dongguan, Guangdong 523903, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of four different antibacterial lotions on the growth and expression of virulence of *Staphylococcus aureus*, and to analyze the inhibitory principle of different components lotions on *Staphylococcus aureus*. **Methods** The minimum inhibitory concentrations of four antibacterial lotions were determined by broth microdilution method. The integrity of bacterial cytoplasmic membrane was detected by ultraviolet absorption spectrophotometry. Finally, the effect of *Staphylococcus aureus* after lotions on the secretion of tumor necrosis factor (TNF)- α by human mononuclear macrophages was determined by TNF- α detection kit (ELISA). **Results** The minimum inhibitory concentration of lotion B and lotion D was 6.20 mg/mL. The minimum inhibitory concentration of lotion A and lotion C was 3.10 mg/mL, the inhibition effect from high to low was as following: A>C>B>D, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Four kinds of antibacterial lotion have certain antibacterial effect, and the antibacterial lotion C has good antibacterial effect, which is widely used, moderate in price and suitable for promotion.

Key words: antibacterial lotion; *Staphylococcus aureus*; bacteriostasis effect

近年来,金黄色葡萄球菌的临床检出率逐年增加,在球菌检出率中居第一位^[1]。作为一种可导致人畜共患病的条件致病菌,其可通过分泌不同的毒力因子引发各类感染^[2-3]。当人体免疫力下降时,金黄色葡萄球菌更易引发人体各组织器官的化脓性炎症,严重者甚至会引起心内膜炎、脑膜炎以及败血症等致死性疾病^[4-6]。另一方面,金黄色葡萄球菌极易定植于女性生殖道内,是近年来女性细菌性阴道炎、盆腔炎发病率升高的主要原因,并且对处于妊娠期的女性患者而言,金黄色葡萄球菌的感染甚至会导致新生儿早产以及妊娠流产^[7]。目前,耐药金黄色葡萄球菌广泛存在,对感染的患者而言,除正确运用抗菌药物外,对

患处进行正确的消毒及有效的冲洗也起着十分重要的作用,因此,进一步探讨当前市面上常见的抗菌洗液对金黄色葡萄球菌的抑制作用具有重要意义^[8-9]。本课题组选取了 4 种不同抗菌机制的洗液进行研究,旨在为临床后期应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 试验菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC43300。

1.2 试剂与仪器 4 种洗液均购于广东省东莞国药集团有限公司,其主要成分如下:A 是由纳米银颗粒为主要成分组成的抗菌洗液;B 是由苦参、冰片、黄柏为主要成分组成的中药制剂;C 是以葡萄柚种子为基本原料所提取的一种新型植物抗菌剂;D 是由蛇床

* 基金项目:广东省东莞市科学技术局项目(202050715025009)。

作者简介:黄少隆,女,主管技师,主要从事临床微生物检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:dgtpzy@126.com。

本文引用格式:黄少隆,张翠惠,黄冬枚,等.4 种抗菌洗液对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J].检验医学与临床,2021,18(23):3380-3383.

子、苍术、薄荷、苦参以及金银花为主要成分组成的中药制剂。肿瘤坏死因子(TNF)- α 检测试剂盒(ELISA)购于康朗生物科技有限公司;单核巨噬细胞系购于美国模式培养物研究所;RPMI-1640培养基购于普赛诺生命科技有限公司;VITEX 比浊仪购自法国生物梅里埃公司;酶标仪购于普朗公司;电子天平购自衡平仪器仪表有限公司;紫外分光光度计购自普美达公司。

1.3 方法

1.3.1 不同抗菌洗液对金黄色葡萄球菌生长的影响 采用美国临床实验室标准协会(CLSI)推荐的肉汤微量稀释法,将 A、B、C、D 抗菌洗液按梯度稀释后,分别添加到无菌的 96 孔板中,其中第 1 孔至第 11 孔分别加入稀释好的不同浓度的抗菌洗液 10 μ L,第 12 孔加入等量的灭菌水作为阴性对照。4 种抗菌洗液第 1 孔到第 11 孔各药物浓度分别为 200.00、100.00、50.00、25.00、12.50、6.20、3.10、1.50、0.75、0.37、0.18 mg/mL。将金黄色葡萄球菌培养复苏,并放培养箱中培养 18 h 至对数生长期,通过麦氏比浊法定量,制备浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的菌悬液,即 0.5 麦氏浊度。用 MH 肉汤稀释 1 000 倍后,每孔中加入 100 μ L 菌悬液,盖上盖子后在培养箱中培养 24 h 后判断结果,同时测定每孔菌液 600 nm 处吸光度(A_{600})值。以首先出现完全抑制金黄色葡萄球菌生长的小孔药物浓度为最低抑菌浓度(MIC)。用含有 0.5 及 1 倍 MIC 的抗菌洗液的培养基培养金黄色葡萄球菌 24 h,分别于 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、24.0 h 取对应菌液 10 μ L 涂布于 MH 平板,以孵育时间为横坐标,以菌落数为纵坐标绘制抑菌曲线。

1.3.2 金黄色葡萄球菌在不同抗菌洗液作用后对紫

外吸收物质渗透量检测 用含有 0.5 以及 1 倍 MIC 的抗菌洗液的培养基培养金黄色葡萄球菌,在菌液与药液混合后,金黄色葡萄球菌的终浓度为 1.5×10^5 CFU/mL,抗菌洗液终浓度分别为 0.5 以及 1 倍 MIC。分别于 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 后取相应菌液 5 000 r/min 下离心 15 min,再经 0.2 μ m 的滤膜过滤上清液后在 260 nm 下测定悬浮液吸光度(A_{260})值,以纯净水替代抗菌洗液作用后的菌体悬浮液作空白对照。时间为横坐标,以 A_{260} 值为纵坐标绘制曲线。

1.3.3 TNF- α 的检测 将人单核细胞 THP-1 细胞放置于 RPMI-1640 培养基中在 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 环境下培养,按规定时间更换培养液。诱导分化 THP-1 细胞后加入事先配制好浓度的 A、B、C、D 抗菌洗液预处理 2 h,弃掉上清液后分别向其中加入 2×10^6 CFU/mL 金黄色葡萄球菌的菌悬液,刺激 12 h 后,以 5 000 r/min 的转速离心以收集细胞培养液,随后使用 TNF- α 检测试剂盒(ELISA)测定 TNF- α 水平。将不受抗菌洗液与金黄色葡萄球菌作用的 THP-1 细胞设置为空白对照组 E。将只受金黄色葡萄球菌作用的 THP-1 细胞设置为阴性对照组 SA。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件处理数据。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 F 检验。计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同抗菌洗液处理后金黄色葡萄球菌的 MIC B、D 洗液的 MIC 为第 6 孔,即 MIC=6.20 mg/mL。A、C 的 MIC 为第 7 个孔,即 MIC=3.10 mg/mL。不同抗菌洗液处理后的金黄色葡萄球菌的 A_{260} 值见表 1。1 倍 MIC 与 0.5 倍 MIC 下的抑菌曲线见图 1、2。

表 1 不同浓度抗菌洗液处理后的金黄色葡萄球菌的 A_{600} 值

抗菌洗液	200.00 mg/mL	100.00 mg/mL	50.00 mg/mL	25.00 mg/mL	12.50 mg/mL	6.20 mg/mL	3.10 mg/mL	1.50 mg/mL	0.75 mg/mL	0.37 mg/mL	0.18 mg/mL	阴性对照
A	0.024	0.028	0.028	0.025	0.028	0.028	0.026	0.063	0.072	0.082	0.088	0.024
B	0.024	0.025	0.026	0.025	0.025	0.026	0.058	0.066	0.088	0.09	0.095	0.024
C	0.024	0.024	0.024	0.025	0.026	0.026	0.022	0.078	0.080	0.089	0.088	0.024
D	0.024	0.028	0.028	0.028	0.026	0.027	0.068	0.065	0.076	0.095	0.099	0.024

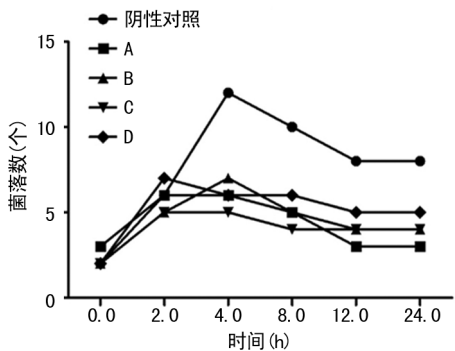


图 1 金黄色葡萄球菌在 1 倍 MIC 下的抑菌曲线

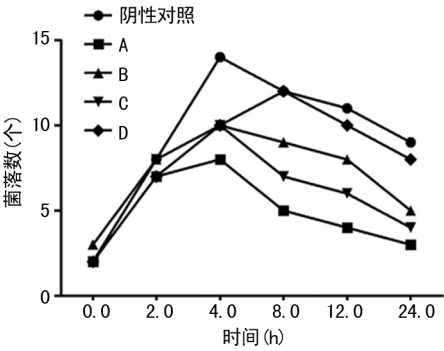


图 2 金黄色葡萄球菌在 0.5 倍 MIC 下的抑菌曲线

2.2 金黄色葡萄球菌在不同抗菌洗液作用后的 A_{260} 检测结果 结果显示,4 种抗菌洗液对金黄色葡萄球菌作用后,其 A_{260} 值与抗菌洗液的浓度成正比,浓度越高, A_{260} 值越高。见图 3、4。

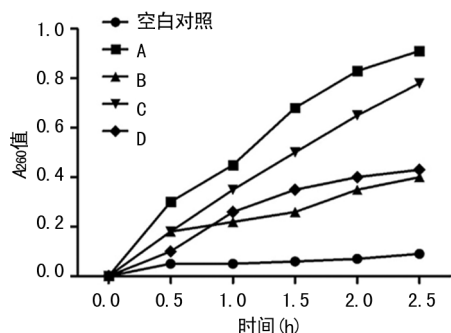


图 3 1 倍 MIC 下金黄色葡萄球菌的 A_{260} 值

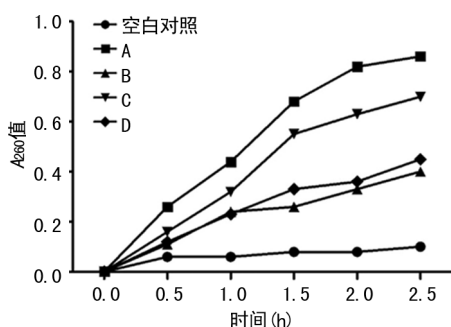


图 4 0.5 倍 MIC 下金黄色葡萄球菌的 A_{260} 值

2.3 不同抗菌洗液作用 THP-1 细胞后分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 水平的比较 不同抗菌洗液作用 THP-1 细胞后均产生抑制作用,且抑制效果呈浓度依赖关系,抑制效果分别为 $A > C > B > D$,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5、6。

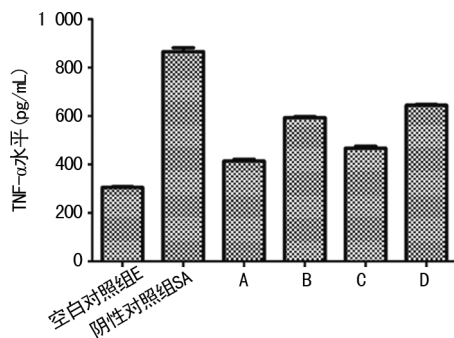


图 5 1 倍 MIC 下对金黄色葡萄球菌刺激后 THP-1 细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 水平

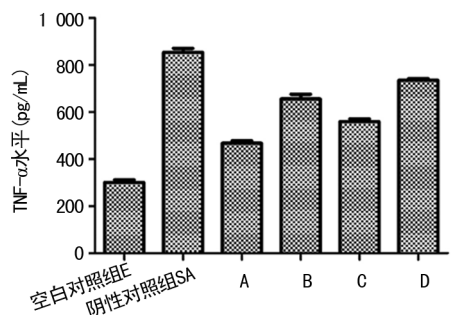


图 6 0.5 倍 MIC 对金黄色葡萄球菌刺激后 THP-1 细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 水平

3 讨论

本研究通过分析 4 种抗菌洗液对金黄色葡萄球菌生长、细胞质膜完整性和刺激 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌 3 个方面的影响作用,证实了这 4 种抗菌洗液对金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌效果。其中,A 与 C 洗液抑菌效果优于另外两种,MIC 为 3.10 mg/mL,主要原因为抗菌机制不同。

A 洗液是一类新型抗菌剂,通过纳米银颗粒直接进入菌体内部,通过与代谢蛋白酶结合,使菌体窒息死亡,具有抑菌杀菌作用强大、抗耐药性及作用持久等优点,具有传统无机抗菌剂无法比拟的抗菌效果^[10]。但是,此类洗液对使用及保存要求较高,金属银过敏者禁用,且切勿入口,需存放于避光、干燥、通风处,以免失效。C 洗液主要为葡萄柚种子提取物,是一种高效无毒的抗菌剂,近年来已广泛应用于各种污染手术的冲洗中,可有效预防术后感染。有研究表明,葡萄柚种子提取物还具有调节菌群生态平衡,调节女性阴道内酸碱度平衡的功效,其主要通过促进女性阴道内活性氧的吸收,调节阴道内细菌的增殖,进而实现消炎灭菌的目的^[11]。目前市面上此类抗菌洗液的品牌比较少,还未被大众广泛应用。B 配方中主要含苦参、冰片、黄柏等中药成分,性质温和,常用于会阴部位的日常清洁。同时还具有活血化瘀、减轻伤口疼痛感以及促进伤口恢复等特点^[12],可用于女性会阴伤口护理。D 洗液主要由蛇床子、苍术、薄荷、苦参以及金银花等成分组成,主治女性湿热带下,如阴部瘙痒红肿,白带量多,色黄或如豆渣状,口苦口干,尿黄便结,对于霉菌性、滴虫性阴道炎有清热燥湿以及止痒的效果,更适合女性妇科炎症常规使用^[13-14]。

金黄色葡萄球菌生存及感染均基于菌体的完整性,在自然环境中,细胞壁及细胞质膜可以阻挡内容物的泄漏同时吸取养分,形成一个特殊的生物屏障,既保障了渗透压的稳定也在一定程度上阻挡外界有害因素的侵扰,是极为重要的组成部分。当屏障受损时,细胞内容物才会发生泄漏,最初是相对分子质量比较小的一些无机盐和微量元素,其次是一些大分子,如蛋白质及核酸。在 260 nm 处,B 及 D 洗液的 A 值明显低于其他两种洗液,说明其对金黄色葡萄球菌细胞膜的破坏作用较小,这可能由于中药复方类型的洗液性质温和,没有直接作用破坏细胞膜的靶点。

4 类抗菌洗液均可抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 水平的分泌且与浓度相关,A 洗液抑制效果最好,而 D 最差。这可能与纳米银颗粒相对分子质量较小可以更快进入细菌内,与相关的酶结合使其失活有关。C 作用仅次于 A 洗液,可能与 C 的主要成分也是小分子物质,比其他两种药物更易渗入细胞有关。

同时,本研究发现 D 洗液的抑菌效果较差,其他 3 种洗液按照抑菌效果从高到低分别为 $A > C > B$ 。但是,A 洗液价格较为昂贵,使用及保存要求高,所以

在生活中未能广泛使用。同时,本研究证明 C 洗液也具有良好的抗菌效果,价格适中,但国内商品化的产品较少,选择性低,不为大众所熟知,可在人们日常生活中推广使用。中药配伍洗液因杀菌谱较广以及可减少细胞耐药性等优势,近年来已被广泛应用。沈炜等^[15]研究发现中药“妇洗液”治疗育龄期女性阴道炎的疗效显著,且疗效明显优于克痒舒洗液。

本研究亦存在一些不足。首先,金黄色葡萄球菌毒力因子的调控机制非常复杂,本试验虽研究 4 种抗菌洗液对抑制 TNF- α 水平的影响,但却并未探讨其对金黄色葡萄球菌的基因表达及彼此之间的关系及具体影响机制,后期有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王娜,张珍珍,张伟东. 2012—2019 年某医院血流感染病原菌变迁及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(1): 62-67.
- [2] TAM K, TORRES V J. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes[J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(2): 10. 1128.
- [3] LEE B, OLANIYI R, KWIECINSKI J M, et al. Staphylococcus aureus toxin suppresses antigen-specific T cell responses[J]. J Clin Invest, 2020, 130(3): 1122-1127.
- [4] GALAR A, WEIL A A, DUDZINSKI D M, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus prosthetic valve endocarditis: pathophysiology, epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and management [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00041-18.
- [5] CHEN F, CHEN Y, ZHAO X, et al. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST59 in a Chinese adult with meningitis: a case report from China [J]. Infect Drug Resist, 2020, 13: 2011-2016.
- [6] KWIECINSKI J M, HORSWILL A R. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms[J]. Curr Opin Microbiol, 2020, 53: 51-60.
- [7] MILSTONE A M, VOSKERTCHIAN A, KOONTZ D W, et al. Effect of treating parents colonized with Staphylococcus aureus on transmission to neonates in the intensive care unit: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2020, 323(4): 319-328.
- [8] ESPEDIDO B A, GOSBELL I B. Chromosomal mutations involved in antibiotic resistance in Staphylococcus aureus [J]. Front Biosci (Schol Ed), 2012, 4: 900-915.
- [9] 赵莉莉,路晓森,田瑞雪,等. 不同冲洗液用于超声根管预备抗菌效果的对比分析[J]. 全科口腔医学杂志, 2020, 7(5): 6-7.
- [10] 姜晓春,王艳秋,孙利群,等. 邦伊清舒纳米银抗菌洗液消毒效果试验观察[J]. 中国卫生工程学, 2016, 15(3): 299-300.
- [11] 刘秀花,郭彩虹,王慧,等. GSE 抗菌洗液口腔护理预防呼吸机相关性肺炎的效果分析[J/CD]. 实用临床护理学电子杂志, 2017, 2(22): 138-140.
- [12] 杨世梅. 千玉洁洗液用于重症患者会阴护理中的效果观察[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(14): 2945-2945.
- [13] 胡建,廖莉琳. 洁尔阴洗液联合甲硝唑阴道泡腾片对老年性阴道炎的治疗效果观察[J]. 药品评价, 2019, 16(23): 46-47.
- [14] 王亚萍,陈锴,李东琴,等. 坤泰洗剂体外抗阴道毛滴虫的效果[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2018, 25(1): 7-11.
- [15] 沈炜,陈学奇,吕玲,等. 中药妇洗液治疗妇女阴道炎 63 例疗效观察[J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(6): 434-435.

(收稿日期: 2021-03-02 修回日期: 2021-06-22)

(上接第 3379 页)

- [6] 刘小玲,廖群,易良,等. 脑脊液乳酸在术后感染中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(5): 592-594.
- [7] 张洪微,窦榕榕,渠雪红,等. 血清降钙素原在开颅术后颅内感染早期诊断中的价值[J]. 中国临床神经外科杂志, 2016, 21(12): 756-758.
- [8] SALOTTOLO K, LEVY A S, SLONE D S, et al. The effect of age on glasgow coma scale score in patients with traumatic brain injury [J]. JAMA Surg, 2014, 149(7): 727-734.
- [9] TANG J, LONG W, YAN L, et al. Procalcitonin guided antibiotic therapy of acute exacerbations of asthma: a randomized controlled trial [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 596.
- [10] 胡青芳,杜衍晓,乔蕾,等. PCT 检测对口腔颌面部多间隙感染病情及预后的意义[J]. 青岛大学医学院学报, 2016, 52(5): 601-603.
- [11] 赵梦雅,段美丽. 血乳酸和乳酸清除率与降钙素原联合检测对脓毒症患者病情严重程度及预后评估的临床意义 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(4): 449-453.
- [12] 龙汉春,张艳萍,彭国光,等. 脑脊液乳酸在承认颅内感染定性中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(9): 2021-2023.
- [13] 罗明,王莉平,袁春梅,等. 血清降钙素原和 C 反应蛋白联合检测指导肺部疾病患者抗菌药物应用的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(13): 1913-1914.
- [14] ZHANG L, MA L, ZHOU X, et al. Diagnostic value of procalcitonin for bacterial meningitis in children: a comparison analysis between serum and cerebrospinal fluid procalcitonin levels [J]. Clin Pediatr (Phila), 2019, 58(2): 159-165.
- [15] RESHI Z, NAZIR M, WANI W, et al. Cerebrospinal fluid procalcitonin as a biomarker of bacterial meningitis in neonates [J]. J Perinatol, 2017, 37(8): 927-931.

(收稿日期: 2021-04-08 修回日期: 2021-08-26)