

人参皂苷 Rh2 联合万古霉素对万古霉素耐药型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜和抑菌效果的影响

张霄霄¹, 邵海连¹, 戈伟¹, 汪定成¹, 董轲¹, 应后群²

1. 中国人民解放军空军军医大学第二附属医院检验科, 陕西 西安 710038;

2. 南昌大学第二附属医院核医学科, 江西 南昌 330006

【摘要】目的 研究人参皂苷 Rh2 联合万古霉素对万古霉素耐药型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜和抑菌效果的影响。**方法** 诱导万古霉素耐药型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(VRSA), 分别用 10 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、90 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 处理 VRSA 作为不同浓度人参皂苷 Rh2 处理组; VRSA 分别用 1 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素处理, 作为不同浓度万古霉素处理组; 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素共同作用 VRSA 记为 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组; 不作处理的 VRSA 作为空白对照组。原始分离的对万古霉素敏感型的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌作为 VSSA 组。结晶紫法检测生物膜形成能力; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 *fnbA*、*atlA* 表达水平; 分光光度计检测菌活性。**结果** 与 VSSA 组比较, VRSA 组生物膜的光密度值及 *fnbA*、*atlA* 的表达水平均明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与空白对照组比较, 16 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素及 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素处理的 VRSA 增殖活性明显降低, 而 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素处理的 VRSA 增殖活性明显低于不同浓度人参皂苷 Rh2 处理组, 且明显高于 4 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素处理者, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与空白对照组比较, 不同浓度人参皂苷 Rh2 处理的 VRSA 生物膜的光密度值明显降低, *fnbA*、*atlA* 的表达水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与空白对照组比较, 不同浓度万古霉素处理的 VRSA 中 *fnbA*、*atlA* 表达水平显著升高, 4 $\mu\text{g/mL}$ 和 16 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素处理的 VRSA 生物膜的光密度值也明显升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与空白对照组比较, 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 组及 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组 VRSA 生物膜的光密度值及 *fnbA*、*atlA* 的表达水平明显降低, *fnbA*、*atlA* 的表达水平明显升高, 且 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组 VRSA 生物膜的光密度值及 *fnbA*、*atlA* 的表达水平均显著高于 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 组, 但明显低于 1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** 人参皂苷 Rh2 可抑制 VRSA 生物膜形成, 但不抑菌; 万古霉素可抑菌但不能抑制生物膜形成, 两者联用能抑制生物膜形成且增强万古霉素的抑菌作用。

【关键词】 人参皂苷 Rh2; 万古霉素; 耐药性; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 生物膜; 活性

【中图分类号】 R378.1[†] **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2023)04-0457-05

Effects of ginsenosides Rh2 combined with vancomycin on vancomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm and antibacterial effect. ZHANG Xiao-xiao¹, SHAO Hai-lian¹, GE Wei¹, WANG Ding-cheng¹, DONG Ke¹, YING Hou-qun². 1. Department of Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of PLA Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, CHINA; 2. Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ginsenosides Rh2 combined with vancomycin on vancomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms and antibacterial effects. **Methods** Vancomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) was induced and treated with 10 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 90 $\mu\text{g/mL}$ ginsenosides Rh2 as different concentrations of ginsenoside treatment groups. VRSA was treated with 1 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin as different vancomycin-treated groups. VRSA was treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2 and 1 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin as 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin group. VRSA without treatment was used as a blank control group. The originally isolated vancomycin-sensitive *Staphylococcus aureus* (VSSA) were enrolled as VSSA group. The crystal violet method was used to detect the biofilm formation ability. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expressions of *fnbA* and *atlA* level. The spectrophotometer was used to detect the bacterial activity. **Results** Compared with VSSA group, the optical density value of biofilm and the expression levels of *fnbA* and *atlA* in VRSA group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the proliferative activity of VRSA treated with 16 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin and 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin decreased significantly; and the proliferation activity of VRSA treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin was

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81702090)。

第一作者: 张霄霄(1988—), 女, 硕士, 主管检验技师, 主要研究方向为临床微生物检验工作及细菌耐药性研究。

通讯作者: 董轲(1971—), 男, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为病毒或肿瘤疫苗、肿瘤分子生物学研究, E-mail: zhanjinper@163.com。

significantly lower than that treated with different concentrations of ginsenoside Rh2 and significantly higher than that treated with 4 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the optical density of VRSA biofilm treated with different concentrations of ginsenoside Rh2 decreased significantly, and the expression levels of *fnbA* and *atlA* decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the expression levels of *fnbA* and *atlA* in VRSA treated with different concentrations of vancomycin were significantly increased, and the optical density of VRSA biofilm treated with 4 $\mu\text{g/mL}$ and 16 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin increased significantly ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the optical density and the expression levels of *fnbA* and *atlA* of VRSA biofilm in 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2 group and 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin group were significantly decreased, while the expression levels of *fnbA* and *atlA* were significantly increased. The optical density of VRSA biofilm and the expression levels of *fnbA* and *atlA* in 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin group were significantly higher than those in 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2 group, but significantly lower than those in 1 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin group ($P<0.05$). **Conclusion** Ginsenosides Rh2 can inhibit the formation of VRSA biofilms, but can not inhibit bacteria. Vancomycin can inhibit bacteria but not biofilms, and the combination of them can inhibit biofilm formation and enhance the antibacterial effect of vancomycin.

【Key words】 Ginsenoside Rh2; Vancomycin; Drug resistance; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Bio-film; Activity

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是感染的主要病原菌之一,由于其耐药性的产生,导致临床治疗困难,降低其耐药性是临床治疗的重要途径之一^[1]。万古霉素是临床上治疗 MRSA 的首选药,但其不合理使用会导致耐万古霉素菌株的菌株产生,从而导致 MRSA 感染的治疗变得十分困难^[2]。细菌耐药性与生物膜的形成有关,生物膜是病原体在体内外黏附于物体表面,通过细菌和胞外多聚物、细胞外基质连接形成的高度组织化结构。有研究表明中药具有抗 MRSA 生物膜产生的作用,可降低其耐药性^[3],如桂皮中的桂皮醛、黄芩中的黄芩苷以及人参中的人参皂苷 Rh2 等。桂皮醛能显著增强万古霉素抗 MRSA 生物膜的作用^[4],黄芩苷能破坏金黄色葡萄球菌生物膜的形成,增强万古霉素对其清除作用^[5]。而人参皂苷 Rh2 是人参的主要有效成分,其不仅有着改善记忆、神经保护等药理作用,还具有抑菌活性和抑菌生物膜的功能^[6-7],且人参皂苷 Rh2 单体能抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成^[8]。本实验旨在研究人参皂苷 Rh2 联合万古霉素对万古霉素耐药型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜和抑菌效果的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及培养基 人参皂苷 Rh2 购自上海融禾医药科技发展有限公司,批号:150108,纯度: $>98\%$;注射用盐酸万古霉素购自重庆莱美药业股份有限公司,批号:160814,规格:500 mg;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)购自武汉纯度生物科技有限公司,货号:CD-B2007S-PYJ。

1.1.2 仪器及试剂盒 逆转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司,货号:WE0149-NXR;ELX808 酶标仪购自美国 Bio-Tek

公司;BS-MFL-01 麦氏比浊仪购自北京金洋万达科技有限公司;Bio-rad 分光光度计购自北京赛百奥科技有限公司。

1.2 万古霉素耐药型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的诱导 收集本院临床分离并鉴定的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),用接种环挑取单个菌落于含万古霉素浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 TSB 培养基中,于 35℃ 下培养 24 h,选取生长的菌落用下一浓度(比前一次增加 1 $\mu\text{g/mL}$)的万古霉素 TSB 培养基培养,同时每一浓度连续传代 4 次以稳定万古霉素耐药特征,直至在含 16 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素的培养上仍能生长的菌落作为万古霉素耐药型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA);原始分离的命名为万古霉素敏感型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(vancomycin-sensitive *S. aureus*, VSSA)。

1.3 细胞处理与分组 VRSA 分别用 10 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、90 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 处理,作为不同浓度人参皂苷 Rh2 处理组;VRSA 分别用 1 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素处理,作为不同浓度万古霉素处理组;10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素共同作用 VRSA 记为 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组;不作处理的 VRSA 作为空白对照组;原始分离的对万古霉素敏感型的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌作为 VSSA 组。

1.4 生物膜形成实验 挑取单个菌落于 4 mL TSB 培养基中 35℃,120 r/min 震荡培养 24 h,将菌液调至 0.5 麦氏浊度,然后吸取 10 μL 至含 190 μL TSB 培养液的 96 孔板中,35℃ 培养 24 h 后每孔用蒸馏水轻轻漂洗 3 次,干燥固定 1 h 后加入 100 μL 结晶紫溶液室温染色 10 min,蒸馏水洗去过量染料,待干燥后用酶标仪检测 590 nm 处吸光度值(A),实验重复 3 次,每次设 3 个复孔。

1.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测 *fnbA*、*at-1A* 表达水平 各组菌液培养至对数生长期时用 Trizol 试剂提取 RNA, 逆转录后进行 PCR, 其反应体系总共为 25 μ L, 其中 EvaGreen 2 \times qPCR MasterMix-ROX 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环。以 16S RNA 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算相对表达量。*fnbA* 上游引物序列: 5'-TGGTGTCTCGGTGGCGTTGGTG-3', 下游引物序列: 5'-GCGAAGCAGGTCACGTTGGAG-3'; *at1A* 上游引物序列: 5'-AACAGCACCAACGGATTAC-3', 下游引物序列: 5'-CATAGTCAGCATAGTTATTCATTG-3'; 16S RNA 上游引物序列: 5'-CGTGCTACAATGGA-CAATACAAA-3', 下游引物序列: 5'-ATCTACGAT-TACTAGCGATTCCA-3'。

1.6 菌活性检测 各实验组分别挑取单个菌落于 TSB 培养液中在 35 $^{\circ}$ C、120 r/min 条件下震荡培养 24 h, 用分光光度计检测 600 nm 处吸光度值(A), 实验重复 3 次, 每次设 3 个复孔。

1.7 统计学方法 应用 SPSS20.0 软件进行数据统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两两比较行两独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VSSA 组与 VRSA 组的生物膜形成能力及生物膜形成相关基因比较 与 VSSA 组比较, VRSA 组生物膜的光密度值及 *fnbA*、*at1A* 的表达水平明显升高, 差异有统计学意义(*P*<0.05), 见表 1。

表 1 VSSA 组与 VRSA 组的生物膜形成能力及生物膜形成相关基因比较($\bar{x}\pm s$, *n*=9)

Table 1 Comparison of biofilm formation ability and biofilm formation related genes between VSSA group and VRSA group ($\bar{x}\pm s$, <i>n</i> =9)			
组别	A ₅₉₀	<i>fnbA</i>	<i>at1A</i>
VSSA 组	0.93 \pm 0.12	1.00 \pm 0.18	1.00 \pm 0.19
VRSA 组	1.89 \pm 0.15	5.73 \pm 0.24	3.64 \pm 0.22
<i>t</i> 值	14.993	47.300	27.246
<i>P</i> 值	0.001	0.001	0.001

2.2 人参皂苷 Rh2 和万古霉素单用及联用对 VRSA 增殖活性的影响 与空白对照组比较, 不同浓度人参皂苷 Rh2 处理的 VRSA 增殖活性差异无统计学意义(*P*>0.05)。16 μ g/mL 万古霉素及 10 μ g/mL 人参皂苷 Rh2+1 μ g/mL 万古霉素处理的 VRSA 增殖活性明显降低; 而 10 μ g/mL 人参皂苷 Rh2+1 μ g/mL 万古霉素处理的 VRSA 增殖活性明显低于不同浓度人参皂苷 Rh2 处理组, 且明显高于 4 μ g/mL 万古霉素处理者, 差异均有统计学意义(*P*<0.05), 见表 2。

表 2 人参皂苷 Rh2 和万古霉素单用及联用对 VRSA 增殖活性的影响($\bar{x}\pm s$, *n*=9)

Table 2 Effects of Ginsenoside Rh2 and Vancomycin alone and in combination on proliferation of VRSA ($\bar{x}\pm s$, *n*=9)

组别	A ₆₀₀
空白对照组	1.13 \pm 0.13
10 μ g/mL 人参皂苷 Rh2 组	1.11 \pm 0.14 ^c
30 μ g/mL 人参皂苷 Rh2 组	1.12 \pm 0.15 ^d
90 μ g/mL 人参皂苷 Rh2 组	1.10 \pm 0.12 ^e
1 μ g/mL 万古霉素组	1.12 \pm 0.13 ^f
4 μ g/mL 万古霉素组	1.03 \pm 0.16 ^g
16 μ g/mL 万古霉素组	0.78 \pm 0.10 ^h
10 μ g/mL 人参皂苷 Rh2+1 μ g/mL 万古霉素组	0.81 \pm 0.11 ^b
<i>F</i> 值	10.922
<i>P</i> 值	0.001

注: 与空白对照组比较, ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.05; 与 10 μ g/mL 人参皂苷 Rh2+1 μ g/mL 万古霉素组比较, ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.05, ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.05, ^g*P*<0.05。

Note: Compared with blank control group, ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.05; Compared with 10 μ g/mL ginsenoside Rh2+1 μ g/mL vancomycin group, ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.05, ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.05, ^g*P*<0.05。

2.3 不同浓度人参皂苷 Rh2 对 VRSA 生物膜形成及相关基因表达的影响 与空白对照组比较, 不同浓度人参皂苷 Rh2 处理的 VRSA 生物膜的光密度值明显降低, *fnbA*、*at1A* 的表达水平明显降低, 差异均有统计学意义(*P*<0.05), 见表 3。

表 3 不同浓度人参皂苷 Rh2 对 VRSA 生物膜形成及相关基因表达的影响($\bar{x}\pm s$, *n*=9)

Table 3 Effects of different concentrations of ginsenoside Rh2 on VRSA biofilm formation and related gene expression ($\bar{x}\pm s$, *n*=9)

组别	A ₅₉₀	<i>fnbA</i>	<i>at1A</i>
空白对照组	1.92 \pm 0.09	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.09
10 μ g/mL 人参皂苷 Rh2 组	0.96 \pm 0.08 ^a	0.41 \pm 0.06 ^d	0.37 \pm 0.06 ^g
30 μ g/mL 人参皂苷 Rh2 组	0.51 \pm 0.07 ^b	0.32 \pm 0.07 ^e	0.28 \pm 0.06 ^h
90 μ g/mL 人参皂苷 Rh2 组	0.27 \pm 0.06 ^c	0.16 \pm 0.05 ^f	0.13 \pm 0.05 ⁱ
<i>F</i> 值	748.557	258.986	293.288
<i>P</i> 值	0.001	0.001	0.001

注: 与空白对照组比较, ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.05, ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.05, ^g*P*<0.05, ^h*P*<0.05, ⁱ*P*<0.05。

Note: Compared with the blank control group, ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.05, ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.05, ^g*P*<0.05, ^h*P*<0.05, ⁱ*P*<0.05。

2.4 不同浓度万古霉素对 VRSA 生物膜形成及相关基因表达的影响 与空白对照组比较, 不同浓度万古霉素处理的 VRSA 中 *fnbA*、*at1A* 表达水平明显升高; 4 μ g/mL 和 16 μ g/mL 万古霉素处理的 VRSA 生物膜的光密度值明显升高, 差异均有统计学意义(*P*<0.05), 见表 4。

2.5 人参皂苷 Rh2 和万古霉素联用对 VRSA 生物膜形成及相关基因表达的影响 与空白对照组比较, 10 μ g/mL 人参皂苷 Rh2 组及 10 μ g/mL 人参皂苷 Rh2+1 μ g/mL 万古霉素组 VRSA 生物膜的光密度值及

fnbA、*atlA* 的表达水平明显降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),而 1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组 VRSA 生物膜的光密度值无显著变化,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。 *fnbA*、*atlA* 的表达水平明显升高;10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组 VRSA 生物膜的光密度值及 *fnbA*、*atlA* 的表达水平均明显高于 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 组,但明显低于 1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 5。

表 4 不同浓度万古霉素对 VRSA 生物膜形成及相关基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 4 Effects of different concentrations of vancomycin on VRSA biofilm formation and related gene expression ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	A_{590}	<i>fnbA</i>	<i>atlA</i>
空白对照组	1.92 \pm 0.09	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.09
1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组	1.96 \pm 0.09	1.53 \pm 0.07 ^c	1.61 \pm 0.07 ^t
4 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组	2.19 \pm 0.08 ^a	2.36 \pm 0.08 ^d	2.31 \pm 0.06 ^g
16 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组	2.37 \pm 0.07 ^b	2.97 \pm 0.06 ^e	2.86 \pm 0.05 ^h
<i>F</i> 值	61.677	1326.426	1261.130
<i>P</i> 值	0.001	0.001	0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.05$,^c $P<0.05$,^d $P<0.05$,^e $P<0.05$,^f $P<0.05$,^g $P<0.05$,^h $P<0.05$,ⁱ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$, ^e $P<0.05$, ^f $P<0.05$, ^g $P<0.05$, ^h $P<0.05$, ⁱ $P<0.05$ 。

表 5 人参皂苷 Rh2 和万古霉素联用对 VRSA 生物膜形成及相关基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 5 Effects of ginsenoside Rh2 combined with vancomycin on VRSA biofilm formation and related gene expression ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	A_{590}	<i>fnbA</i>	<i>atlA</i>
空白对照组	1.92 \pm 0.09	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.09
10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 组	0.96 \pm 0.08 ^{ai}	0.41 \pm 0.06 ^{ck}	0.37 \pm 0.06 ^{fm}
1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组	1.96 \pm 0.09 ^j	1.53 \pm 0.07 ^{dl}	1.61 \pm 0.07 ^{en}
10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组	1.32 \pm 0.07 ^b	0.58 \pm 0.05 ^e	0.53 \pm 0.05 ^h
<i>F</i> 值	296.390	493.462	595.838
<i>P</i> 值	0.001	0.001	0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.05$,^c $P<0.05$,^d $P<0.05$,^e $P<0.05$,^f $P<0.05$,^g $P<0.05$,^h $P<0.05$;与 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2+1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素组比较,ⁱ $P<0.05$,^j $P<0.05$,^k $P<0.05$,^l $P<0.05$,^m $P<0.05$,ⁿ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, by LSD-*t* test, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$, ^e $P<0.05$, ^f $P<0.05$, ^g $P<0.05$, ^h $P<0.05$; And 10 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2 + 1 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin group, ⁱ $P<0.05$, ^j $P<0.05$, ^k $P<0.05$, ^l $P<0.05$, ^m $P<0.05$, ⁿ $P<0.05$ 。

3 讨论

MRSA 是造成感染的主要病原体,随着抗菌药物的长期使用和滥用,其耐药性日益严重,给临床治疗带来巨大困难,增加 MRSA 菌株对抗生素的敏感性对临床治疗具有重要意义^[9]。生物膜能够阻滞抗生素和机体防御系统对膜内细菌的杀伤,所以生物膜的形成是造成细菌耐药的重要原因,抑制生物膜的形成是增强药物敏感性的重要途径^[10]。*fnbA* 基因可以编码 *fnbA* 蛋白,*fnbA* 蛋白主要负责金黄色葡萄球菌与宿主细胞

和细胞外基质进行黏附和生物被膜的形成。而 *atlA* 基因可以编码产生细菌自溶素^[11]。本实验通过用不同浓度的万古霉素诱导 MRSA 形成 VRSA,与 VSSA 比较,VRSA 中生物膜的光密度值显著升高,*fnbA*、*atlA* 表达水平明显升高。说明 VRSA 的耐药性可能与生物膜形成有关。

万古霉素是 MRSA 感染患者的一线用药^[12]。本实验用 1 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素处理 VRSA,结果显示,万古霉素可上调 *fnbA*、*atlA* 表达,4 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素可促进生物膜形成。而万古霉素对 VRSA 抑菌作用较弱,仅浓度为 16 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素具有较强的抑菌效果。研究发现中药提取物对 MRSA 具有抑菌作用,可调节其耐药敏感性^[13]。研究报道人参皂苷 Rb1 对金黄色葡萄球菌有一定的抑菌作用,浓度越高抑菌作用越强^[14]。人参皂苷对金黄色葡萄球菌生物被膜具有显著的抑制作用,随着药物浓度的增加,其抑制率显著增加^[15]。人参皂苷 Rh2 能在体外抑制致龋菌生物膜形成^[16]。人参皂苷 Rh2 通过抑制 NorA 联合环丙沙星增强其对金黄色葡萄球菌的抑菌作用^[17]。本实验结果显示,不同浓度人参皂苷 Rh2 对 VRSA 菌活性无明显影响,但人参皂苷可抑制 VRSA 生物膜形成和 *fnbA*、*atlA* 表达。说明人参皂苷 Rh2 可抑制 VRSA 生物膜形成,但抑菌效果不明显。且本实验用 10 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rh2 联合 1 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素作用可抑制 VRSA 生物膜形成和 *fnbA*、*atlA* 表达,且其比单独万古霉素处理,菌活性降低,说明两者联合作用可增强万古霉素对 VRSA 的抑菌作用。

综上所述,人参皂苷 Rh2 可抑制 VRSA 生物膜形成,但不抑菌;万古霉素可抑菌但不能抑制生物膜形成,而两者联用能抑制生物膜形成且人参皂苷 Rh2 可增强万古霉素的抑菌作用,其联合作用机制仍有待进一步的研究证实。

参考文献

- [1] Ma X, Sun J. Drug resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2016, 31(4): 259-263.
马香,孙静.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性[J].中华实用儿科临床杂志,2016,31(4): 259-263.
- [2] Cheng X, Li XO, Liu XF, et al. Research progress of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and its resistance to vancomycin [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2016, 20(10): 1785-1787.
程欣,李晓鸥,刘晓峰,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌及其对万古霉素耐药的研究进展[J].中国实验诊断学,2016,20(10): 1785-1787.
- [3] Lu GY, Lu R, Lin ZZ, et al. Research Progress on the effect of traditional Chinese medicine extracts on the drug resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. International Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018,40(10): 996-999.
陆桂玉,鲁茹,林浙哲,等.中药提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性影响的研究进展[J].国际中医中药杂志,2018,40(10):

- 996-999.
- [4] Zhang YJ, Pan H, Du JH, et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde combined with vancomycin on the biofilm of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Kunming Medical University, 2018, 39(4): 58-61.
张雅娟, 潘红, 杜佳慧, 等. 桂皮醛联合万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜的抑制作用[J]. 昆明医科大学学报, 2018, 39(4): 58-61.
- [5] Chen Y, Chen YQ, Kong JL, et al. Effect of baicalin combined with vancomycin on *Staphylococcus aureus* biofilm *in vitro* [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2014, 24(2): 264-267.
陈艳, 陈一强, 孔晋亮, 等. 黄芩苷联合万古霉素对金黄色葡萄球菌生物膜的体外影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(2): 264-267.
- [6] Liu D, Zhang H, Sun HY, et al. Research progress on antibacterial activity of ginsenosides [J]. Chinese Journal of Pathogenic Biology, 2018, 13(12): 130-132.
刘迪, 张浩, 孙宏宇, 等. 人参皂苷抑菌活性研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(12): 130-132.
- [7] Zhang HR, Ye AQ, Zhang YW, et al. Research progress on derivatization and biological activity of ginsenoside [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(14): 4554-4567.
张浩然, 叶安琪, 张跃伟, 等. 人参皂苷衍生化及生物活性研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(14): 4554-4567.
- [8] An JH, Zhang YZ, Han SS, et al. Effect of Ginsenoside on biofilm formation of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2018, 56(7): 28-32.
安继红, 张永州, 韩姗姗, 等. 人参皂苷对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2018, 56(7): 28-32.
- [9] Dong PX, Tuo Y. Research progress of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection [J]. Laboratory Medicine And Clinic, 2015, 12(1): 116-118.
董鹏霞, 托娅. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染研究进展[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(1): 116-118.
- [10] Ying XJ. Research and control progress of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. Chinese Journal of Disinfection, 2019, 36(7): 546-551.
应小俊. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜的研究及防治进展[J]. 中国消毒学杂志, 2019, 36(7): 546-551.
- [11] Wu C, Sun YN, Jin BN, et al. Research progress of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(13): 2069-2074.
吴春, 孙永宁, 金波娜, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(13): 2069-2074.
- [12] Yu FF, Luo ZX. Individualized anti-infective treatment strategy of vancomycin in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in children. [J]. Chinese Journal of Practical Pediatrics, 2022, 37(2): 99-103.
于菲菲, 罗征秀. 万古霉素在儿童社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌肺炎的个体化抗感染治疗策略[J]. 中国实用儿科杂志, 2022, 37(2): 99-103.
- [13] Guan CP, Feng L, Qiao X, et al. Antibacterial effect and reversal mechanism of different traditional Chinese medicine extracts on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(12): 1997-2001.
管翠萍, 冯磊, 乔霞, 等. 不同中药提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用和逆转机制[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(12): 1997-2001.
- [14] Yin LJ, Zhou ZQ, Shao Y, et al. Study on the antibacterial effect of berberine hydrochloride, ginsenoside Rb1, baicalin and chlorogenic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Medical Recapitulate, 2016, 22(24): 4969-4972.
尹良军, 周振旗, 绍元, 等. 盐酸小檗碱、人参皂苷Rb1、黄芩苷及绿原酸对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究[J]. 医学综述, 2016, 22(24): 4969-4972.
- [15] Zhang HH, Jiang XH, Fang JJ. Inhibitory effect of Ginsenoside on *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. Chinese Modern Doctor, 2018, 56(2): 16-18, 22.
张慧华, 姜新华, 方水晶. 人参皂苷对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用[J]. 中国现代医生, 2018, 56(2): 16-18, 22.
- [16] Cao xx, Ye QL, Zhou LB, et al. Experimental study on inhibition of cariogenic bacteria biofilm by ginsenoside Rh2 [J]. J Oral Sci Res, 2018, 34(12): 1302-1306.
曹茜茜, 叶倩琳, 周立波, 等. 人参皂苷Rh2抑制致龋菌生物膜的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(12): 1302-1306.
- [17] Zhang J, Sun Y, Wang Y, et al. Non-antibiotic agent ginsenoside 20 (S)-Rh2 enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin *in vitro* and *in vivo* as a potential NorA inhibitor [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740(1): 277-284.

(收稿日期:2022-06-16)