

蹄叶橐吾萃取物对金黄色葡萄球菌的抗菌消炎作用研究

张春艳¹, 郭明飞², 乌仁高娃², 吴丽娟², 乌吉木², 胥向红², 刘万全³

(1.赤峰学院基础医学院内蒙古人类遗传病研究重点实验室, 内蒙古 赤峰 024005;

2.赤峰学院基础医学院, 内蒙古 赤峰 024005;

3.齐齐哈尔医学院基础医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:目的 研究蹄叶橐吾醇化乙酸乙酯萃取物(EEOLF)对金黄色葡萄球菌的抗菌消炎作用。方法 测定 EEOLF 对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC);取正常培养的巨噬细胞 RAW264.7 为空白组,采用金黄色葡萄球菌作用于 RAW264.7 细胞建立体外实验模型(模型组)。细胞活/死染色观察 EEOLF(剂量为 5 $\mu\text{g/ml}$)作用于模型组后细胞的损伤情况,ELISA 法测定 EEOLF(剂量为 1.25、2.5 及 5 $\mu\text{g/ml}$)作用于模型组后 IL-1 β 及 TNF- α 的释放量。结果 EEOLF 对金黄色葡萄球菌生长有抑制作用,最小抑菌浓度为 1300 $\mu\text{g/ml}$;当金黄色葡萄球菌作用于 RAW264.7 细胞后,细胞发生严重损伤,同时 IL-1 β 及 TNF- α 的分泌量增加($P<0.05$)。对金黄色葡萄球菌感染的细胞给药后,药物浓度为 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 和 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 时,炎症因子的分泌量没有明显减少($P>0.05$),当药物浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 时,炎症因子 L-1 β 及 TNF- α 的分泌量下降($P<0.05$),同时细胞损伤情况改善。结论 EEOLF 能够抑制金黄色葡萄球菌生长,也能缓解金黄色葡萄球菌引起的炎症反应,其抗菌消炎作用值得深入研究。

关键词:蹄叶橐吾醇化乙酸乙酯萃取物;金黄色葡萄球菌;抗菌消炎

中图分类号:R259

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2024.12.019

文章编号:1006-1959(2024)12-0089-05

Study on the Antibacterial and Anti-inflammatory Effects of Ligulariafischeri Extract on Staphylococcus Aureus

ZHANG Chun-yan¹, GUO Ming-fei², WUREN Gao-wa², WU Li-juan², WU Ji-mu², XU Xiang-hong², LIU Wan-quan³

(1.Inner Mongolia Key Laboratory of Human Genetic Disease Research, Basic Medical College, Chifeng University, Chifeng 024005, Inner Mongolia, China;

2.Basic Medical College, Chifeng University, Chifeng 024005, Inner Mongolia, China;

3.Basic Medical College, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: Objective To study the antibacterial and anti-inflammatory effects of ethanolic extract of ligulariafischeri (EEOLF) on *Staphylococcus aureus*. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) of EEOLF against *Staphylococcus aureus* was determined. Normal cultured macrophages RAW264.7 were taken as blank group, and *Staphylococcus aureus* was applied to RAW264.7 cells to establish cell inflammation model group in vitro (model group). The cell damage after EEOLF (5 $\mu\text{g/ml}$) in the model group was detected by living/dead staining, and the release of IL-1 β and TNF- α after EEOLF (1.25, 2.5 and 5 $\mu\text{g/ml}$) in the model group was determined by ELISA. **Results** EEOLF could inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, and the MIC was 1300 $\mu\text{g/ml}$. When *Staphylococcus aureus* acted on RAW264.7 cells, the cells were severely damaged, and the secretion of IL-1 β and TNF- α was increased ($P<0.05$). When the drug concentration was 1.25 $\mu\text{g/ml}$ and 2.5 $\mu\text{g/ml}$, the secretion of inflammatory factors was not significantly reduced ($P>0.05$). When the drug concentration was 5 $\mu\text{g/ml}$, the secretion of inflammatory factors L-1 β and TNF- α was decreased ($P<0.05$), and the cell damage was improved. **Conclusion** EEOLF can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and alleviate the inflammatory response caused by *Staphylococcus aureus*, and its antibacterial and anti-inflammatory effects are worthy for further study.

Key words: Ligulariafischeri alcoholized ethyl acetate extract; *Staphylococcus aureus*; Antibacterial and anti-inflammatory

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起皮肤和软组织感染的主要病原体之一^[1],若感染控制不佳可能造成大面积感染或菌血症等不良后果。抗生素是治疗金黄色葡萄球菌感染的首选药物。但是随着抗生素的应用,金黄色葡萄球菌的耐药性逐渐增强,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 出现并在全球

范围内散播^[2],是导致乳腺炎以及医院和社区获得性肺炎发病率、死亡率居高不下的主要原因,严重危害着社会公共卫生^[3]。目前,MRSA 感染引起的相关疾病尚无最佳治疗方案。如何治疗耐药性逐渐增高的金黄色葡萄球菌引起的感染是目前研究的热点之一。中药对细菌感染的治疗作用被认为类似于抗生素的作用^[4-6],从中草药中寻找新型药物用来抵抗或治疗耐药菌株引起的感染已成为解决细菌耐药性的有效途径。蹄叶橐吾(*Ligulariafischeri*, LF)为菊科(*compositae*)蹄叶橐吾属(*Ligularia*)多年生草本植物,多生长于海拔 1400~3300 米的河流、山川及森林^[7]。LF 的根、茎、叶及全草均有很高的药用价值。其

基金项目:1.赤峰学院青年科研基金项目(编号:CFXYQNZR2230);

2.内蒙古自治区自然科学基金项目(编号:2024QN08078)

作者简介:张春艳(1988.1-),女,内蒙古赤峰人,博士,讲师,主要从事抗炎免疫药理学研究

根和根茎可用于治疗慢性支气管炎、咽喉炎症、肺痛咳血等,已收入吉林省药材标准,全草用于治疗丹毒炎症和关节脓肿,地上部分外敷用于捻挫伤,水煎服可治疗痔疾^[8]。LF 叶片提取物在抗炎、抗肿瘤、抗氧化等方面显示出潜在的药用价值^[9-11]。根据中国《中药材记录》记载,LF 除了上述作用外还有抗菌作用^[12],但关于 LF 抗菌作用的研究较少,EEOLF 是否对细菌生长有抑制作用还有待于进一步确认。因此,本研究初步探究 EEOLF 对金黄色葡萄球菌的生长作用,并建立金黄色葡萄球菌感染的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型,探讨 EEOLF 对金黄色葡萄球菌感染的功效,为解决金黄色葡萄球菌的临床耐药性问题提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 细胞小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购于北京协和医学院。菌种金黄色葡萄球菌(ATCC29213)为华中农业大学周锐教授馈赠。药品 LF 为齐齐哈尔医学院李涛教授在延边市安图县采摘并馈赠。试剂包括:FBS 胎牛血清(美国 Hyclone 公司),乙二胺四乙酸(EDTA,美国 Sigma 公司),四甲基二乙胺(TEMED,美国 Sigma 公司),DMEM 培养基干粉(美国 Gibco 公司),L-1 β 及 TNF- α ELISA 试剂盒(博士德生物科技有限公司),活死染色试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)。

1.2 仪器 DY5000X 倒置显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司),BIO-RAD 680 全自动酶标仪(美国 BIO-RAD 公司),超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),VS-1300L-U 净化工作台(苏州净化设备有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 EEOLF 制备 干燥的 LF 叶片 8.5 kg,粉碎后,室温下,每次用无水乙醇 15 L 浸泡 3 d 后过滤,重复 3 次,合并醇提液,减压浓缩至小体积(约 1.0 L),加水 1.5 L,用乙酸乙酯萃取 3 次,每次用乙酸乙酯 1.5 L,合并乙酸乙酯层浓缩至恒重,得率为 0.61%,减压浓缩,真空干燥,每克相当于 10 g 生药。使用时 DMSO 溶解后用 PBS 稀释,滤过除菌,并分装储存。

1.3.2 抗菌药物最低抑菌浓度试验(MIC) 将 EEOLF 制成 10400 $\mu\text{g/ml}$ 的原液,增菌后的对数生长期金黄色葡萄球菌液用生理盐水或 LB 肉汤培养基校正浓度至 0.5 麦氏比浊标准,约含 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/ml。取无菌试管 6 支,排成一排,除第 1 管加入 1.6 ml LB 肉汤外,其余每管加入 LB 肉汤 1 ml,依次倍比

稀释,第 6 管为不含药物的生长对照。此时各管药物浓度依次为 5200、2600、1300、650、325、0 $\mu\text{g/ml}$ 。然后在每管内加入上述制备好的接种物各 1 ml,使每管最终菌液浓度约为 5×10^5 CFU/ml。将接种好的稀释管塞好塞子,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 16~20 h 后用分光光度计测定 OD₆₀₀。

1.3.3 细胞培养及分组处理 取 RAW264.7 巨噬细胞在 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)培养 2 d、处于对数生长期、生长状态良好的 RAW264.7 细胞,经 1 \times PBS 清洗 2 次,每次 3 ml,用刮刀刮取细胞,并用细胞培养液吹打混匀,于细胞计数板上计数,加培养液稀释至浓度为 5×10^4 个/ml,接种于 6 孔板中,继续培养,待巨噬细胞处于对数生长期且形成致密融合单层后分组处理。先前研究采用噻唑蓝比色法(MTT 法)测得 EEOLF 作用于密度为 5×10^4 个/ml 的 RAW264.7 细胞 24 h 后,药物对细胞的无毒浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$,故本实验采用的最大药物浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 。空白对照组,加入不含血清培养基培养 12 h;模型组,先加入金黄色葡萄球菌培养 7 h(感染复数 MOI 为 4),建立感染模型;EEOLF 处理组,向模型组加入 EEOLF(终浓度分别为 1.25、2.5、5 $\mu\text{g/ml}$)继续培养 5 h。

1.3.4 活/死染色试验 取空白对照组、模型组及 EEOLF 处理组(终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$),根据试剂盒说明书对细胞进行活/死(绿/红)染色,置于倒置荧光显微镜下观察细胞活力,绿色表示活细胞,红色表示死细胞^[1]。

1.3.5 细胞因子检测 取空白对照组、模型组、EEOLF 处理组(终浓度分别为 1.25、2.5、5 $\mu\text{g/ml}$),用 ELISA 试剂盒检测上清 TNF- α 和 IL-1 β 分泌情况。将 8、400、200、100、50、25、12.5 pg/ml 的标准品各 100 μl 依次加入孔中,另取 1 孔只加细胞培养上清作为阴性对照,每个浓度设置 3 个复孔;酶标板加上封板膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 90 min;依次加入生物素抗小鼠 IL-1 β 抗体 100 μl ;酶标板加上封板膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min;洗涤缓冲液洗涤 3 次,每次浸泡 1 min 左右(每孔洗液至少 300 μl);将准备好的 ABC 工作液按每孔 100 μl 依次加入;酶标板加上封板膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min;洗涤缓冲液洗涤 5 次,每次浸泡 1~2 min 左右(每孔洗液至少 300 μl)。分别加入显色剂 A 和 B,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min;加终止液,在酶标仪 450 nm 处测量各孔的吸光度 A。

1.4 统计学方法 通过 GraphPad Prism 5.0 软件进行处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EEOLF 对金黄色葡萄球菌的抑制作用 在金黄色葡萄球菌肉汤培养基中加入不同浓度的 EEOLF 后培养, 置 37 ℃摇床培养 16~20 h 后用分光光度计测定 OD₆₀₀, 发现在药物浓度为 1300 μg/ml 时 OD₆₀₀ 值降低, 说明 EEOLF 对金黄色葡萄球菌的生长有抑制作用, 且最小抑菌浓度为 1300 μg/ml, 见表 1。

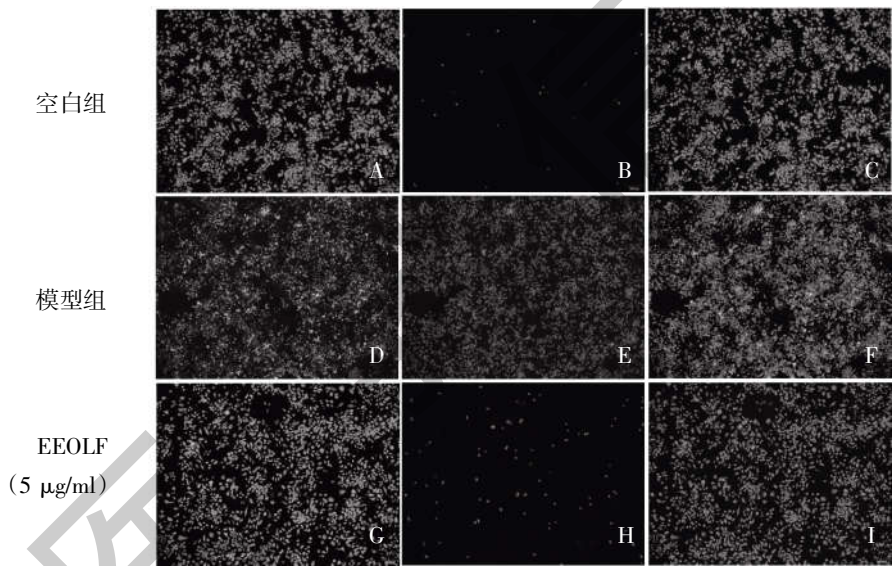
2.2 EEOLF 减轻金黄色葡萄球菌感染造成的 RAW264.7 细胞损伤 对细胞进行活/死染色, 置于倒置荧光显微镜下观察发现, 空白组细胞损伤较少, 见图 1A~图 1C; 金黄色葡萄球菌刺激后(模型组)

细胞损伤较为严重, 见图 1D~图 1F; 加入终浓度为 5 g/ml 的 EEOLF 后, 细胞损伤减轻, 说明 EEOLF 能够减轻金黄色葡萄球菌感染造成的细胞损伤, 见图 1G~图 1I。

2.3 EEOLF 降低金黄色葡萄球菌感染导致的炎症反应 与空白对照组相比, 模型组 TNF-α 和 IL-1β 的分泌量升高 (P<0.05)。加入终浓度分别为 1.25、2.5、5 μg/ml 的 EEOLF 分别作用于模型组的 RAW264.7 细胞后, 发现 5 μg/ml 组 TNF-α 和 IL-1β 的分泌量减少 (P<0.05), 表明 EEOLF 能降低炎症细胞中 TNF-α 和 IL-1β 的释放, 见图 2。

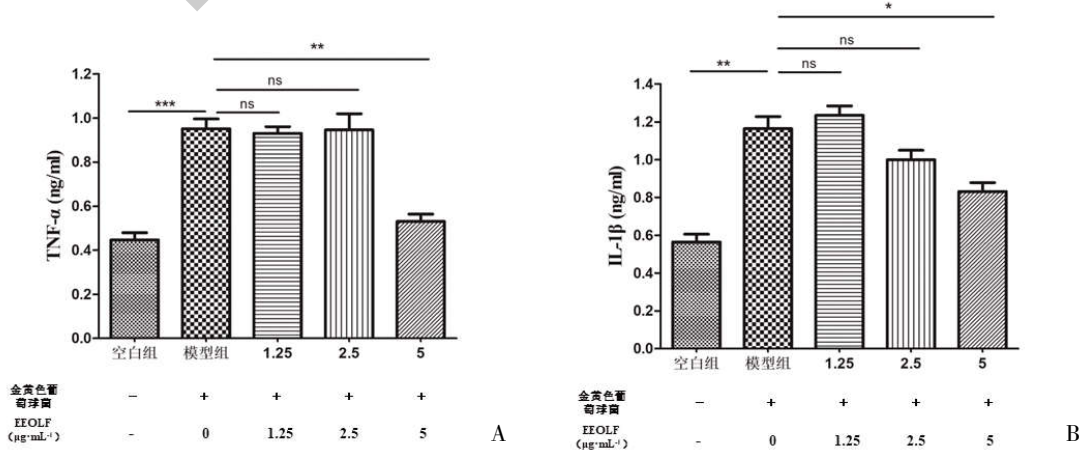
表 1 MIC 实验测定 EEOLF 对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(mg/ml)

OD ₆₀₀	5.2			2.6			1.3			0.65			0.325			0		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	0.190	0.193	0.199	0.181	0.183	0.179	0.189	0.197	0.184	0.338	0.341	0.339	0.84	0.842	0.843	1.23	1.11	1.18



注: A~C: 空白对照组; D~F: 模型组; G~I: EEOLF 组。

图 1 不同因素处理后的 RAW264.7 的细胞经活死染色后的状态



注: 与模型组比较, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; A: 每组 TNF-α 的释放量; B: 每组 IL-1β 的释放量。

图 2 不同因素处理后的 RAW264.7 细胞炎症因子的表达

3 讨论

抗生素耐药性问题对于全球公共卫生来说是一项巨大的威胁和挑战,特别是 MRSA 的出现给社会造成了重大的经济损失^[13]。金黄色葡萄球菌肺炎是一种流行的社区和医院获得性传染病,发病率和死亡率都很高^[14]。因此,亟需替代疗法来对抗耐药细菌的感染。

中药可通过破坏细菌结构、抑制细菌的群体感应系统、分泌系统或毒力因子降低细菌致病性;在与抗生素联用下,中药通过改变细胞膜结构、减弱外排泵外排作用等增强抗生素功效;此外,中药通过消除炎症反应提高机体免疫功能而抗细胞感染^[15,16]。所以,从中草药中挖掘新型抗菌消炎药物已成为解决当今细菌的耐药性问题有效途径。

LF 为我国传统中药,主要分布在我国东北长白山、内蒙古等地,因其药理作用广泛、廉价易采摘等优势而具有很大的开发价值^[9]。研究发现 LF 地上部分乙醇提取物可通过 JNK、p38MAPK 通路和 NF- κ B 等通路达到抗炎的作用^[17-20]。除此以外,LF 对机体免疫系统也有一定的调节作用,如通过抑制小鼠单核巨噬细胞吞噬功能,增加小鼠血清溶血素含量,促进脾淋巴细胞增殖从而增强体液免疫功能^[21]。

根据我国《中药材》专著描述 LF 还具有抗菌作用^[12],但是目前关于 LF 在这方面的研究较少。本研究发现 EEOLF 对金黄色葡萄球菌的生长有抑制作用, MIC 为 1300 μ g/ml,说明 LF 地上部分具有抑菌作用,具体作用机制还有待于进一步研究。

巨噬细胞是炎症反应的重要参与者,介导了炎症过程中各种免疫病理的发展,金黄色葡萄球菌感染巨噬细胞后,会导致细胞损伤并释放各种炎症因子^[22]。TNF- α 位于炎症瀑布的上游,可诱导巨噬细胞产生并聚集多种炎症因子和氧自由基,促进 T 细胞浸润,参与局部炎症反应, TNF- α 释放量的多少直接反应炎症的轻重^[23]。IL-1 一般产生于炎症早期,具有介导炎症产生的作用^[9]。本研究通过活/死染色实验发现 EEOLF 浓度为 5 μ g/ml 时,细胞损伤情况有所好转,说明 EEOLF 能够减轻金黄色葡萄球菌引起的小鼠巨噬细胞损伤。通过 ELISA 检测浓度为 1.25、2.5、5 μ g/ml 的 EEOLF 作用于金黄色葡萄球菌感染的细胞时, TNF- α 和 IL-1 β 的释放量,发现 5 μ g/ml 的药物能够抑制 TNF- α 、IL-1 β 的产生,说明 EEOLF 能够减轻金黄色葡萄球菌引起的小鼠巨

噬细胞炎症反应。

先前研究已测得 EEOLF 作用于密度为 5×10^4 个/ml 的 RAW264.7 细胞 24 h 后,药物对细胞的无毒浓度为 5 μ g/ml^[17],因而本研究选择的最大药物浓度为 5 μ g/ml,在此剂量下,EEOLF 不具备抑菌作用,主要发挥抗炎作用,如何使 EEOLF 更好的发挥抑菌消炎双重作用还有待于进一步研究。

综上所述,EEOLF 不但可以通过抑制炎症因子的释放减轻金黄色葡萄球菌引起的感染,而且对细菌的生长有抑制作用。

参考文献:

- [1]Zhang W,Gong Q,Tang Z,et al.The natural product, echinatin, protects mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibition of alpha-hemolysin expression [J].*Front Microbiol*,2023,14:1128144.
- [2]孙宏宇,陈子涵,崔佰吉,等.乌拉草提取物对大鼠皮肤烫伤后金黄色葡萄球菌感染的抑菌作用[J].*吉林大学学报*,2022,49(2):377-384.
- [3]Bassetti M,Labate L,Melchio M,et al.Current pharmacotherapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia[J].*Expert Opin Pharmacother*,2022,23(3):361-375.
- [4]薛芳翰,范秋雨,周雨哲,等.黄芩素对鼠伤寒沙门氏菌抑制作用的研究[J].*现代畜牧兽医*,2019(9):12-15.
- [5]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.
- [6]Dahash SL,Abass OK,Abdul-Razaq MM,et al.Aesculus hippocastanum-Derived Extract β -Aescin and In vitro Antibacterial Activity[J].*J Microsc Ultrastruct*,2021,9(1):26-30.
- [7]Huang X,Gao Y,Xu F,et al.Molecular mechanism underlying the anti-inflammatory effects of volatile components of *Ligularia fischeri* (Ledeb) Turcz based on network pharmacology [J].*BMC Complement Med Ther*,2020,20(1):109.
- [8]张春艳,刘万全,吕艳欣,等.蹄叶橐吾萃取物通过 NF- κ B 通路降低细胞炎症反应 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*,2020,22(6):1849-1855.
- [9]Kim D,Kim GW,Lee SH,et al.*Ligularia fischeri* extract attenuates liver damage induced by chronic alcohol intake [J].*Pharm Biol*,2016,54(8):1465-1473.
- [10]Kim JH,Kim HJ,Kim JK,et al.*Ligularia fischeri* inhibits endothelial cell proliferation, invasion and tube formation through the inactivation of mitogenic signaling pathways and regulation of vascular endothelial cadherin distribution and matrix metalloproteinase expression[J].*Oncol Rep*,2015,34(1):221-226.

(下转第 97 页)

(上接第 92 页)

- [11]Joo IH,Choi JH,Kim DH,et al.Ligularia fischeri ethanol extract: An inhibitor of alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis in B16F10 melanoma cells[J].J Cosmet Dermatol,2023,22(2):637-644.
- [12]李时珍.本草纲目[M].北京:人民卫生出版社,1982.
- [13]Singh I,Roshan M,Vats A,et al.Evaluation of Virulence, Antimicrobial Resistance and Biofilm Forming Potential of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates from Bovine Suspected with Mastitis [J].Curr Microbiol,2023,80(6):198.
- [14]Li Y,Tang Y,Qiao Z,et al.Prevalence and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the respiratory tracts of Chinese adults with community-acquired pneumonia [J].J Infect Public Health, 2023,16(5):713-718.
- [15]高贵阳,黄志昂,黄晓辉,等.鱼腥草等 12 种中药对铜绿假单胞菌的体外抗菌活性研究 [J]. 中医临床研究,2019,11(13): 18-21.
- [16]Ahmed AA,Salih FA.Low concentrations of local honey modulate Exotoxin A expression, and quorum sensing related virulence in drug-resistant Pseudomonas aeruginosa recovered from infected burn wounds [J].Iran J Basic Med Sci,2019,22(5): 568-575.
- [17]韩伟佳,程崑,王玉,等.蹄叶橐吾醇化乙酸乙酯萃取物抗炎机制研究[J].中国现代医学杂志,2015,25(15):6-10.
- [18]程崑,韩伟佳,王玉,等.蹄叶橐吾醇化乙酸乙酯萃取物 JNK 通路抗炎机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):183-187.
- [19]Choi EM,Suh KS.Ligularia fischeri leaf extract suppresses proinflammatory mediators in SW982 human synovial cells [J].Phytother Res,2009,23(11):1575-1580.
- [20]Kim TH,Truong VL,Jeong WS.Phytochemical Composition and Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Ligularia fischeri Turcz: A Comparison between Leaf and Root Extracts [J].Plants (Basel),2022,11(21):3005.
- [21]李丽波,王玉祥.蹄叶橐吾乙醇提取物对小鼠免疫功能的影响[J].齐齐哈尔医学院学报,2009,30(16):1953-1954.
- [22]贾小演,赵晓歌,谢丹,等.蓼荷根茎乙醇提取物对 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应的影响 [J]. 中药药理与临床, 2023,39(3):71-77.
- [23]林章英,汪元,黄传兵,等.新风胶囊对类风湿关节炎患者的临床疗效及血管内皮生长因子、肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 中医临床研究,2021,13(31):91-93.

收稿日期:2023-06-23;修回日期:2023-07-24

编辑/成森