

# 金银花黄酮脂质体膜的制备及其抗MRSA的机制研究<sup>△</sup>

熊瑞\*,张世鹏,刘恒旭,王璐,来小丹[陆军军医大学第一附属医院江北院区(陆军第九五八医院)药剂科,重庆 400020]

中图分类号 R943;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)21-2616-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.21.07



**摘要** 目的 制备金银花黄酮脂质体膜(LFLM),并研究其抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的作用机制。方法 以大豆磷脂、胆固醇为载体,利用乙醇注入法制备金银花黄酮脂质体,然后将其负载于壳聚糖和聚乙烯醇的混合膜材中制得LFLM。测定金银花黄酮脂质体粒径、多分散性指数(PDI)和LFLM的释放率。设置对照组、LFLM低浓度组(2.5 mg/mL)、LFLM中浓度组(5 mg/mL)、LFLM高浓度组(10 mg/mL)、阳性组(10 μg/mL万古霉素)和联合用药组(10 mg/mL LFLM+10 μg/mL万古霉素),评价LFLM对MRSA菌落形成、存活、生物膜形成的影响;检测MRSA上清液中K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)的含量;检测MRSA中*mecA*、*mecR1* mRNA的表达水平。结果 金银花黄酮脂质体的粒径为(80.91±3.96)nm, PDI为0.26±0.07; LFLM在12 h内的释放率为55%,36 h内的释放率为73%。与对照组比较,LFLM中、高浓度组和阳性组MRSA的菌落形成数均显著减少( $P<0.05$ ),死菌与活菌之比、生物膜抑制率以及上清液中K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、LDH、AKP含量均显著升高( $P<0.05$ ),*mecA*、*mecR1* mRNA表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。LFLM与万古霉素联用后,抗MRSA作用进一步加强。结论 本研究成功制得LFLM,其具有良好的释药性,可通过促进MRSA细胞壁和细胞膜破坏,抑制*mecA*、*mecR1* mRNA表达,从而发挥抗菌作用。

**关键词** 金银花黄酮;脂质体;膜剂;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;抗菌

## Preparation of *Lonicerae japonicae* flavonoids liposome membrane and its antibacterial mechanism against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

XIONG Rui, ZHANG Shipeng, LIU Hengxu, WANG Lu, LAI Xiaodan[Dept. of Pharmacy, Jiangbei Campus of the First Affiliated Hospital of Army Medical University (The 958th Hospital of PLA), Chongqing 400020, China]

**ABSTRACT OBJECTIVE** To prepare *Lonicerae japonicae* flavonoids liposome membrane (LFLM), and to study the mechanism of its anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **METHODS** *L. japonicae* flavonoids liposome (LFL) were prepared by ethanol injection with phospholipids and cholesterol as carriers. LFLM was prepared by loading LFL in mixed membranes of chitosan and polyvinyl alcohol. The particle size of LFL, polydispersity index (PDI) and release rate of LFLM were measured. A control group, LFLM low-concentration group (2.5 mg/mL), LFLM-medium concentration group (5 mg/mL), LFLM high-concentration group (10 mg/mL), positive group (10 μg/mL vancomycin), and combination therapy group (10 mg/mL LFLM and 10 μg/mL vancomycin) were set up. The effects of LFLM on MRSA colony formation and survival as well as the formation of MRSA biofilm were evaluated. The contents of K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, lactic dehydrogenase (LDH), and alkaline phosphatase (AKP) in the supernatant of MRSA were determined. mRNA expressions of *mecA* and *mecR1* in MRSA were determined. **RESULTS** The particle size of LFL was (80.91±3.96) nm, and the PDI was 0.26±0.07. The release rate of LFLM was 55% within 12 h and 73% within 36 h. Compared with the control group, the number of MRSA colony formation decreased significantly in LFLM medium-concentration and high-concentration groups, and the positive group ( $P<0.05$ ). The ratio of dead to live bacteria, biofilm inhibition rate, and the contents of K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, LDH and AKP were increased significantly ( $P<0.05$ ), while the mRNA expressions of *mecA* and *mecR1* were decreased significantly ( $P<0.05$ ). The combination of LFLM and vancomycin further enhanced the anti-MRSA effect. **CONCLUSIONS** LFLM is prepared successfully in the study and has good drug release characteristics. LFLM can exert anti-MRSA activity by promoting cell wall and membrane damage, and suppressing the mRNA expression of *mecA* and *mecR1*.

△基金项目 重庆市科卫联合医学科研项目(No.2022MSXM187)

\*第一作者 主管药师,硕士。研究方向:中药药理学及循证药理学。

E-mail:rxiong2017@sina.com

#通信作者 副主任药师,硕士。研究方向:药剂学及循证药理学。

E-mail:laixiaodan0926@sina.com

**KEYWORDS** *Lonicerae japonicae* flavonoids; liposomes; membrane; *Staphylococcus aureus*; antibacterial

随着广谱抗菌药的广泛使用,细菌耐药率呈逐年升高的趋势,出现了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)等多药耐药菌株,给临床抗感染治疗带来巨大挑战<sup>[1]</sup>。MRSA在全球广泛流行,已成为菌血症、心内膜炎、皮肤和软组织感染、骨和关节感染以及医院获得性感染的主要原因<sup>[2]</sup>。目前,临床上治疗MRSA感染的首选药物是万古霉素(vancomycin, VAN),其次还有利奈唑胺和达托霉素,然而近年来发现VAN对MRSA的最小抑菌浓度出现向上漂移的现象,并且还发现了对上述抗菌药耐药的分离株<sup>[3]</sup>。因此,积极探寻新的抗MRSA药物具有重要意义。

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花,中医理论认为其具有清热解毒、宣风散热的功效,是治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、温病发热之要药<sup>[4]</sup>。现代药理研究表明,金银花具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎、调节免疫等多种活性<sup>[5]</sup>。研究显示,金银花含有挥发油类、有机酸类、黄酮类、三萜及其皂苷类等活性物质,其中绿原酸和黄酮类化合物是其主要的抗菌活性成分,且黄酮类化合物的抗菌作用比绿原酸更强<sup>[5-6]</sup>。由此可知,金银花黄酮(Lonicerae Japonicae Flos flavonoids, LF)有望被开发成抗MRSA相关制剂。

脂质体作为一种新型药物递送系统,对亲水和亲脂药物均有良好的包载能力,并能提高药物的稳定性,还具有良好的生物相容性<sup>[7]</sup>。然而,液体状态的脂质体具有易聚集合并、泄漏药物等缺点<sup>[8]</sup>。膜剂作为一种具有良好生物相容性和黏附性的固体制剂,特别适用于皮肤给药,将脂质体负载于膜剂可有效改善上述缺点。由于MRSA是皮肤和软组织感染的重要病原体,本研究拟将LF制成脂质体膜(LF liposome membrane, LFLM),并探究其对MRSA的抗菌作用及机制,以期为皮肤和软组织的MRSA感染提供新的治疗策略,同时为LF的进一步开发利用奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Zetasizer Nano ZS-90型激光粒度仪(英国Malvern公司), Allegra X-30R型低温离心机(美国Beckman公司), LC-M20A型高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公司), DM4B型荧光显微镜及成像系统(德国Leica公司), Synergy型多功能酶标仪(美国BioTek公司), CFX96型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司), JY2002型电子天平(上海衡平仪器仪表有限公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

LF原料药(批号220601)购于西安天一生物技术股份有限公司;VAN(批号EZ78908353,纯度 $\geq 93\%$ )购于德国BioFroxx公司;大豆磷脂(批号SY-SO-220602)购于艾伟拓(上海)医药科技有限公司;胆固醇(批号9328010130)购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)、壳聚糖(chitosan, CS)、甘油(批号分别为H2117244、B2218417、E2205022)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;木犀草苷(批号ZLX8-JDTW,纯度 $\geq 98\%$ )购于中国食品药品检定研究院;磷酸盐缓冲液(PBS)购于上海碧云天生物技术股份有限公司;水解酪蛋白(Mueller-Hinton, MH)肉汤、MH琼脂(批号分别为20221018、20220914)购于青岛海博生物技术有限公司;细菌活力检测试剂盒(批号2663842)购于美国Invitrogen公司;结晶紫染液(批号2305001)购于北京索莱宝科技有限公司;钾离子( $K^+$ )测定试剂盒、镁离子( $Mg^{2+}$ )测定试剂盒、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)测定试剂盒、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)测定试剂盒(批号分别为20230113、20230213、20230208、20230208)均购于南京建成生物工程研究所有限公司;总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR试剂盒(批号分别为7F762E3、7E782J3、7E12G3)购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PCR引物由通用生物(安徽)股份有限公司合成。

### 1.3 菌株

MRSA菌株(ATCC43300)购于重庆恩诺医疗设备有限公司。

## 2 方法

### 2.1 LFLM的制备及表征

采用乙醇注入法制备LF脂质体<sup>[9]</sup>。称取900 mg LF溶于30 mL纯水中,置于磁力搅拌器上预热至40℃。称取适量大豆磷脂和胆固醇(质量比为15:1)溶于5 mL无水乙醇中,使大豆磷脂质量浓度为35 mg/mL。设置搅拌转速为500 r/min,用注射器缓慢将含大豆磷脂和胆固醇的无水乙醇溶液注入LF溶液中,挥干乙醇后,超声(功率200 W,频率20 kHz)10 min即得LF脂质体。平行制备3批LF脂质体,利用激光粒度仪测定其粒径和多分散性指数(polydispersity index, PDI)。

参考文献方法并适当改进膜材<sup>[9]</sup>:称取2.5 g PVA溶于50 mL 90℃热水中,冷却至室温后加入0.5 mL冰醋酸和0.5 g CS混匀,形成PVA-CS溶液,作为成膜材料。将LF脂质体、PVA-CS溶液和甘油按体积比5:4:1混匀后,铺于平整的玻璃板上,烘干即得LFLM。通过观察膜

的完整性和膜在实验人员手腕背处的黏附性评价膜的品质。

## 2.2 LFLM中LF释放率的测定

取“2.1”项下LFLM置于盛有300 mL PBS的烧杯中,保鲜膜封口后于150 r/min、37 °C恒温摇床上进行释放,分别在不同时间点取出1 mL PBS,同时补充1 mL新的PBS。根据本课题组预实验摸索的HPLC法检测取出的PBS中木犀草苷的含量。色谱柱为Platisil ODS;流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~30 min,15%A→40%A);流速为1 mL/min;进样量为10 μL;检测波长为254 nm。根据LF中木犀草苷的百分含量换算对应的LF含量,以此计算LF释放率,LF释放率(%)=LF含量/LF投入量×100%。

## 2.3 LFLM对MRSA菌落形成的影响

设立6个组别,分别为对照组、LFLM低浓度组(2.5 mg/mL)、LFLM中浓度组(5 mg/mL)、LFLM高浓度组(10 mg/mL)、阳性组(10 μg/mL VAN)和联合用药组(10 mg/mL LFLM+10 μg/mL VAN),上述各药物浓度根据预实验结果设置。利用MH肉汤培养基将各组药物(其中LFLM浓度以LF计,对照组仅含MH肉汤培养基)调整至相应浓度,备用。利用MH肉汤培养基将MRSA菌液浓度调整至OD<sub>600</sub>=0.4[即600 nm波长下,菌液吸光度(OD)值为0.4],然后稀释10 000倍;向各组含药培养基中加入十分之一体积稀释后的MRSA菌液,混匀,取60 μL滴加至MH琼脂平板中央,用涂布器涂布,每组设置3个重复,置于37 °C恒温培养箱中培养24 h观察菌落生长情况,并计数。

## 2.4 LFLM对MRSA存活的影响

按“2.3”项下方法分组,利用MH肉汤培养基将LFLM和VAN调整至相应浓度,药液体积为1 mL,置于2 mL离心管中,加入100 μL MRSA菌液(OD<sub>600</sub>=0.4),置于150 r/min、37 °C恒温摇床上培养6 h。培养结束后,以10 000×g离心10 min,弃上清液,向沉淀中加入1 mL生理盐水重悬后再次离心,弃上清液后加入1 mL生理盐水重悬,加入含5 μmol/L绿色荧光核酸染料SYTO9和30 μmol/L碘化丙啶(pyridine iodide,PI)的染液各1.5 μL混匀,室温避光染色15 min,取10 μL滴至载玻片上。封片后于荧光显微镜下随机选取3个区域采集图像,绿色荧光表示活菌,红色荧光表示死菌。利用Image J软件分别计算绿色荧光和红色荧光区域面积,以此计算死菌与活菌之比。

## 2.5 LFLM对MRSA生物膜形成的影响

按“2.3”项下方法分组,利用MH肉汤培养基将LFLM和VAN调整至相应浓度,药液体积为1 mL,置于

2 mL离心管中,加入100 μL MRSA菌液(OD<sub>600</sub>=0.4)混匀后,加至96孔板中,每孔100 μL,每组设置3个重复。将孔板置于150 r/min、37 °C恒温摇床上培养24 h,吸去含药菌液,以生理盐水润洗2遍后向各孔加入100 μL甲醇固定10 min;弃甲醇后用生理盐水润洗2遍,加入0.5%结晶紫染色30 min;弃染液后用生理盐水润洗2遍,加入100 μL 95%乙醇复溶后,采用酶标仪于590 nm波长下测定OD值,并计算生物膜抑制率,生物膜抑制率(%)=(1-OD<sub>给药组</sub>/OD<sub>对照组</sub>)×100%。

## 2.6 LFLM对MRSA上清液中K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、LDH、AKP释放的影响

按“2.3”项下方法分组,利用MH肉汤培养基将LFLM和VAN调整至相应浓度,药液体积为1 mL,置于2 mL离心管中;将MRSA菌液(OD<sub>600</sub>=0.4)稀释100倍后,取100 μL加入离心管中混匀,每组设置3个重复,置于150 r/min、37 °C恒温摇床上培养24 h,以10 000×g离心10 min;取上清液,按相应试剂盒说明书方法分别检测上清液中K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、LDH、AKP的含量。

## 2.7 LFLM对MRSA中*mecA*、*mecR1* mRNA表达水平的影响

按“2.6”项下方法分组和培养MRSA(培养时间为16 h),每组设置3个重复;培养结束后,离心、弃上清液,沉淀用生理盐水清洗2遍后,收集菌体,根据试剂盒说明书方法提取总RNA,并进行逆转录和PCR扩增,以16s rRNA为内参基因,根据2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算*mecA*、*mecR1* mRNA的表达水平。PCR引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
<i>mecA</i>	上游:GCAATCGCTAAAGAATAAG	225
	下游:AATGGACCAACATAACCTA	
<i>mecR1</i>	上游:ACAGACTTCTTCGGTTAG	336
	下游:GTACAATTTGGGATTTCACT	
16s rRNA	上游:ACTCTACGGGAGGCAGCAG	197
	下游:ATTACCGCGCTGCTGG	

## 2.8 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0.1软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析中的Tukey's多重检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 LFLM的表征结果

LF脂质体的粒径为(80.91±3.96) nm, PDI为0.26±0.07,其粒径分布图见图1。将LF脂质体与膜材料混合后能够顺利起膜,且具有良好的皮肤黏附性,表明LFLM制备成功。释放实验结果显示,LFLM在12 h内释放较快,12 h内累积释放率为55%;12 h以后释放速率减慢,36 h内的累积释放率为73%,释放曲线见图2。

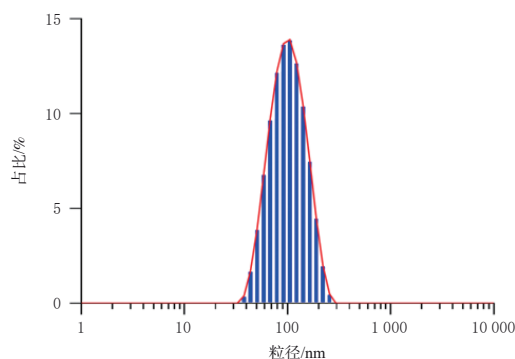


图1 LF脂质体的粒径分布图

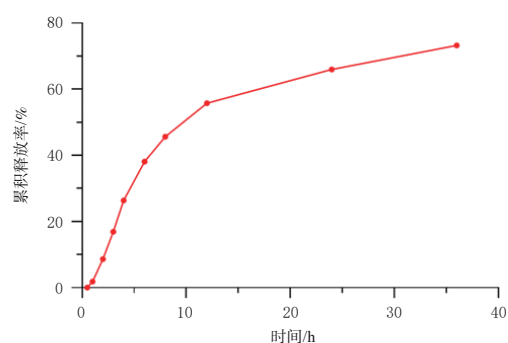


图2 LFLM的释放曲线

### 3.2 LFLM对MRSA菌落形成、存活及生物膜形成的影响结果

MH琼脂平板实验结果显示,与对照组比较,LFLM中、高浓度组和阳性组菌落形成数均显著减少( $P<0.05$ );与阳性组比较,联合用药组菌落形成数显著减少( $P<0.05$ )。细菌染色结果显示,与对照组比较,LFLM中、高浓度组和阳性组死菌与活菌之比均显著升高( $P<0.05$ );与阳性组和LFLM高浓度组比较,联合用药组死菌与活菌之比显著升高( $P<0.05$ )。生物膜形成结果显示,与对照组比较,各药物组生物膜抑制率均显著升高( $P<0.05$ );与阳性组和LFLM高浓度组比较,联合用药组生物膜抑制率均显著升高( $P<0.05$ )。结果见图3、图4、表2。

### 3.3 LFLM对MRSA释放 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、LDH、AKP的影响结果

与对照组比较,各药物组上清液中 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、LDH、AKP含量均显著升高( $P<0.05$ )。与LFLM高浓度组和阳性组比较,联合用药组上清液中 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、LDH、AKP含量均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表3。

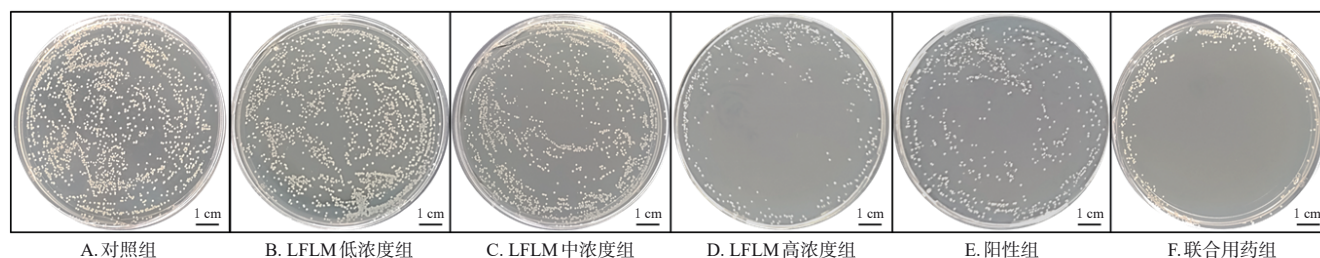


图3 LFLM对MRSA生长的影响结果

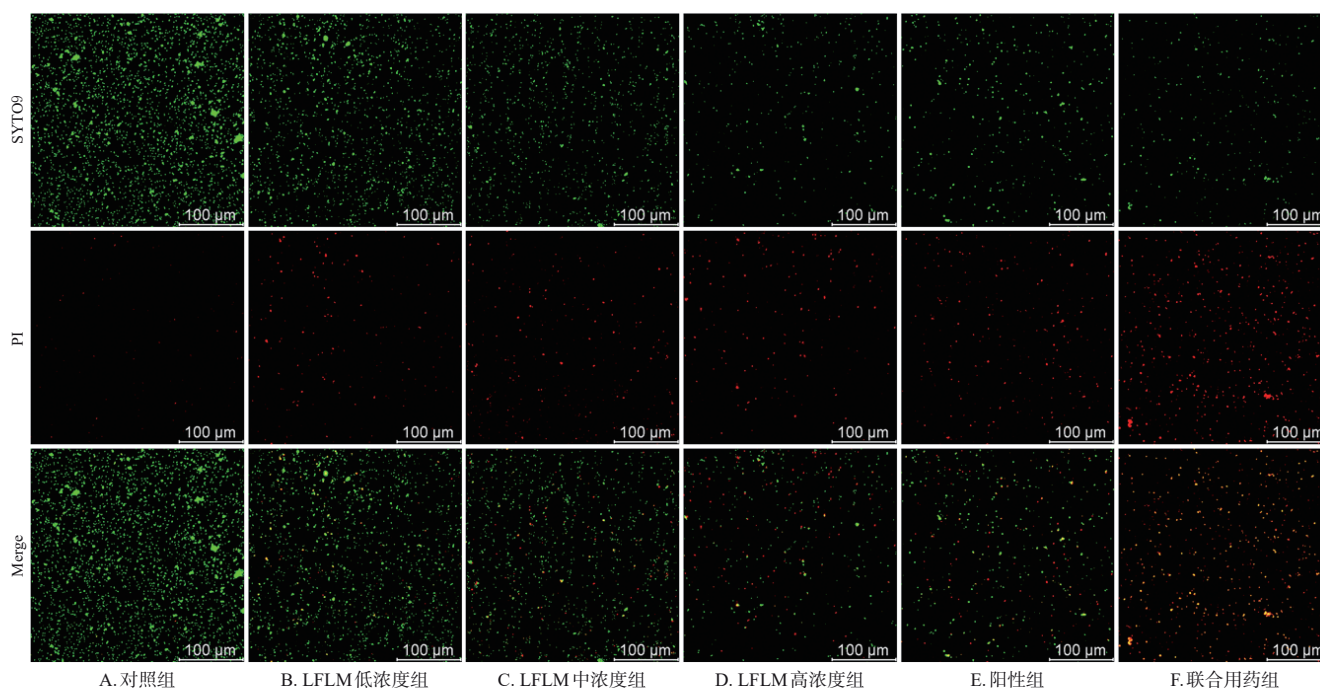


图4 LFLM对MRSA存活的影响结果

表2 各组菌落形成数、死菌与活菌之比、生物膜抑制率测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	菌落形成数/个	死菌与活菌之比	生物膜抑制率/%
对照组	620.00 ± 52.33	0.10 ± 0.01	0.00 ± 5.24
LFLM低浓度组	558.67 ± 49.13	0.27 ± 0.09	57.55 ± 2.82 <sup>a</sup>
LFLM中浓度组	388.00 ± 36.48 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.16 <sup>a</sup>	77.99 ± 1.58 <sup>a</sup>
LFLM高浓度组	162.00 ± 25.66 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.28 <sup>a</sup>	87.09 ± 2.23 <sup>a</sup>
阳性组	304.67 ± 48.23 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.04 <sup>a</sup>	87.32 ± 1.23 <sup>a</sup>
联合用药组	65.33 ± 35.23 <sup>abc</sup>	2.71 ± 0.90 <sup>abc</sup>	96.82 ± 0.32 <sup>abc</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与阳性组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与LFLM高浓度组比较,  $P < 0.05$ 。

表3 各组上清液中  $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、LDH、AKP 含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	$K^+$ /(mmol/L)	$Mg^{2+}$ /(mmol/L)	LDH/(U/L)	AKP/(U/L)
对照组	0.90 ± 0.12	0.08 ± 0.02	116.55 ± 16.67	2.82 ± 2.22
LFLM低浓度组	1.68 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.06 <sup>a</sup>	268.07 ± 9.66 <sup>a</sup>	13.38 ± 0.72 <sup>a</sup>
LFLM中浓度组	1.84 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.13 <sup>a</sup>	410.64 ± 11.03 <sup>a</sup>	21.41 ± 3.09 <sup>a</sup>
LFLM高浓度组	1.98 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.80 ± 0.14 <sup>a</sup>	737.37 ± 1.10 <sup>a</sup>	35.07 ± 1.58 <sup>a</sup>
阳性组	2.22 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.83 ± 0.25 <sup>a</sup>	1 181.04 ± 11.47 <sup>a</sup>	63.80 ± 1.58 <sup>a</sup>
联合用药组	4.20 ± 0.03 <sup>abc</sup>	3.86 ± 0.08 <sup>abc</sup>	2 229.60 ± 34.06 <sup>abc</sup>	119.42 ± 3.21 <sup>abc</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与阳性组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与LFLM高浓度组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.4 LFLM对MRSA中 *mecA*、*mecR1* mRNA 表达水平的影响结果

与对照组比较,各给药组MRSA中 *mecA* (LFLM低浓度组除外)、*mecR1* mRNA 表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。与LFLM高浓度组比较,联合用药组MRSA中 *mecA*、*mecR1* mRNA 表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。结果见表4。

表4 各组MRSA的 *mecA*、*mecR1* mRNA 水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	<i>mecA</i> mRNA	<i>mecR1</i> mRNA
对照组	1.14 ± 0.10	0.98 ± 0.03
LFLM低浓度组	0.93 ± 0.10	0.65 ± 0.05 <sup>a</sup>
LFLM中浓度组	0.53 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.02 <sup>a</sup>
LFLM高浓度组	0.73 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>a</sup>
阳性组	0.11 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.00 <sup>a</sup>
联合用药组	0.15 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.17 ± 0.00 <sup>ab</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与LFLM高浓度组比较,  $P < 0.05$ 。

## 4 讨论

脂质体可通过其磷脂双分子层膜结构将亲水或疏水性药物包裹其中,从而提高药物的水溶性和稳定性,并且具有高度的生物相容性和生物可降解性,是比较理想的药物载体<sup>[7]</sup>。脂质体常用的制备方法包括薄膜分散法、乙醇注入法、逆向蒸发法等,通常制得的粒径在几十到几百纳米之间,利于机体吸收<sup>[10]</sup>。本研究采用的乙醇注入法不使用有毒溶剂,所制得的脂质体具有包封率高、粒径大小均一的优势;不足的是,此法制备速度相对较慢,不利于大量制备。CS是一种天然来源的动物多糖,具有生物降解性、生物相容性、无毒、抑菌、增强免疫

等特性,研究表明,CS修饰不仅可以提高脂质体稳定性,还可增强其抗菌活性<sup>[11]</sup>。PVA是一种无毒水溶性高分子,具有良好生物相容性和成膜特性,常被作为药物制剂的基础成膜材料<sup>[9]</sup>。本研究以CS、PVA、LF脂质体和甘油混合制得的LFLM平整均一,具有良好的韧性和黏附性。

尽管VAN被作为临床抗MRSA的一线药物,但随着抗菌药物的广泛使用,全球范围内分离出越来越多耐VAN的MRSA菌株,因此临床在VAN的基础上进一步探索出了多药联合的抗MRSA方案<sup>[12]</sup>。一些研究表明,中药黄酮类成分与抗生素联合使用可能是对抗MRSA的一种新策略<sup>[13]</sup>,例如:野黄芩苷能通过抑制分选酶A和酪蛋白水解蛋白酶P增强VAN对MRSA引起的致死性肺炎的治疗作用<sup>[14]</sup>;扁柏双黄酮能通过靶向酪蛋白水解蛋白酶P来减轻MRSA的毒力<sup>[15]</sup>。本研究通过体外抗菌实验初步评价了LFLM单用及联用VAN对MRSA的抗菌效果,结果表明,LFLM能够显著抑制MRSA生长、促进其死亡,并在与VAN联合后抗MRSA活性增加。由于细菌生物膜可将细菌包裹在内从而避免遭受抗生素、体内免疫细胞的损伤,因此生物膜是细菌耐药的重要原因,而抑制细菌生物膜的形成则是防止细菌耐药的重要途径<sup>[16]</sup>。本研究发现,LFLM可抑制MRSA生物膜的形成,并且与VAN联合后抑制生物膜形成的效果更佳。可见,LFLM可作为一种潜在的抗MRSA治疗药物。

细菌细胞壁和细胞膜的破坏是其死亡的最常见原因,当细菌细胞壁和细胞膜被破坏,胞内物质易泄露至胞外,从而导致细菌死亡<sup>[17]</sup>。分布于细菌细胞壁和细胞膜之间的AKP和分布于细胞质中的LDH可在细胞壁和细胞膜破坏时释放至胞外,此外,胞内的 $K^+$ 和 $Mg^{2+}$ 也会在细胞膜损伤时泄露增加。因此,菌液中 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、LDH、AKP含量的高低可反映细菌细胞壁和细胞膜的损伤程度。本研究结果显示,经LFLM干预后,MRSA上清液中 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、LDH、AKP含量均升高,这提示MRSA胞内物质泄露增加,推测可能与LFLM破坏了MRSA细胞壁和细胞膜有关,与相关研究结果一致<sup>[18]</sup>。

导致MRSA耐药的主要原因是其具有 *mecA* 基因,该基因编码产生的青霉素结合蛋白2a可阻断 $\beta$ -内酰胺类抗生素对细菌细胞壁的破坏作用;*mecR1*基因对 *mecA* 基因的表达具有调控作用,因此抑制 *mecA*、*mecR1* 基因的表达是改善MRSA耐药的关键<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,LFLM可降低 *mecA*、*mecR1* mRNA 水平,这提示LFLM可能具有改善MRSA耐药性的作用。

综上所述,本研究成功制得LFLM,其具有良好的释药性,可通过促进MRSA细胞壁和细胞膜破坏,抑制 *mecA*、*mecR1* mRNA 表达,从而发挥抗菌作用。

## 参考文献

- [1] MAHJABEEN F, SAHA U, MOSTAFA M N, et al. An update on treatment options for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia: a systematic review[J]. *Cureus*, 2022, 14(11):e31486.
- [2] TURNER N A, SHARMA-KUINKEL B K, MASKARINEC S A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(4):203-218.
- [3] HSIEH R C, LIU R, BURGIN D J, et al. Understanding mechanisms of virulence in MRSA: implications for antivirulence treatment strategies[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2023, 21(9):911-928.
- [4] 韦晶玥, 罗诗雯, 冯龄燃, 等. 金银花与山银花活性成分抗炎作用及机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(11):273-281.
- WEI J Y, LUO S W, FENG L R, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of active constituents from *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*: a review[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(11):273-281.
- [5] CAO Y X, JI P, WU F L, et al. *Lonicerae japonicae* Caulis: a review of its research progress of active metabolites and pharmacological effects[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1277283.
- [6] LI Y K, LI W, FU C M, et al. *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos*: a systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. *Phytochem Rev*, 2020, 19(1):1-61.
- [7] GUIMARÃES D, CAVACO-PAULO A, NOGUEIRA E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications[J]. *Int J Pharm*, 2021, 601:120571.
- [8] 程玉钊, 郝旭亮, 付丽娜, 等. 基于白及多糖的黄藤素纳米柔性脂质体膜剂的制备研究[J]. *中草药*, 2018, 49(11):2551-2556.
- CHENG Y C, HAO X L, FU L N, et al. Preparation of palmatine-loaded flexible nano-liposomes films based on *Bletilla striata* polysaccharides[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(11):2551-2556.
- [9] 李微微, 程岚, 于炜婷, 等. 壳聚糖-聚乙烯醇复合凝胶基质抑菌性能的研究[J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(12):1407-1409.
- LI W W, CHENG L, YU W T, et al. Bacteriostatic effect of chitosan-polyvinyl alcohol gel matrix[J]. *Chin J New Drugs*, 2012, 21(12):1407-1409.
- [10] 王兴芝, 代英辉, 王东凯. 脂质体的制备方法及应用的研究进展[J]. *中国药剂学杂志*, 2024, 22(1):14-24.
- WANG X Z, DAI Y H, WANG D K. Research progress in preparation methods and applications of liposomes[J]. *Chin J Pharm Online Ed*, 2024, 22(1):14-24.
- [11] WANG X W, CHENG F Y, WANG X J, et al. Chitosan decoration improves the rapid and long-term antibacterial activities of cinnamaldehyde-loaded liposomes[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 168:59-66.
- [12] HASSOUN A, LINDEN P K, FRIEDMAN B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations: a review of recent developments in MRSA management and treatment[J]. *Crit Care*, 2017, 21(1):211.
- [13] BAO M, ZHANG L L, LIU B, et al. Synergistic effects of anti-MRSA herbal extracts combined with antibiotics[J]. *Future Microbiol*, 2020, 15:1265-1276.
- [14] WANG X Y, WEI L, WANG L, et al. Scutellarin potentiates vancomycin against lethal pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through dual inhibition of sortase A and caseinolytic peptidase P[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 199:114982.
- [15] KONG X R, WANG B M, CHEN X Y, et al. Hinokiflavone attenuates the virulence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by targeting caseinolytic protease P[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66(8):e0024022.
- [16] ROY R, TIWARI M, DONELLI G, et al. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action[J]. *Virulence*, 2018, 9(1):522-554.
- [17] NGUYEN T L A, BHATTACHARYA D. Antimicrobial activity of quercetin: an approach to its mechanistic principle[J]. *Molecules*, 2022, 27(8):2494.
- [18] 刘欣元, 盛德乔. 金银花有效成分的抗菌作用机制研究进展[J]. *抗感染药学*, 2023, 20(8):783-789.
- LIU X Y, SHENG D Q. Research progress in the antibacterial effect of active ingredients of *Lonicerae Japonicae Flos*[J]. *Anti Infect Pharm*, 2023, 20(8):783-789.
- [19] 邓裕祺, 蔡燕. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药机制[J]. *甘肃医药*, 2022, 41(5):392-396.
- DENG Y Q, CAI Y. Resistance mechanism of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Gansu Med J*, 2022, 41(5):392-396.

(收稿日期:2024-06-06 修回日期:2024-09-16)

(编辑:唐晓莲)