

# 桉树提取物与苯唑西林对 MRSA 的抗菌作用

## Research on antibacterial effect of *eucalyptus* extracts combined with oxacillin against MRSA

崔海英 张雪婧 周慧

CUI Hai-ying ZHANG Xue-jing ZHOU Hui

赵呈婷 李伟 林琳

ZHAO Cheng-ting LI Wei LIN Lin

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

(School of Food & Biological Engineering of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

**摘要:**分别以乙醇和水为提取剂,提取桉树叶中的有效成分,观察其对 7 种耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的抗菌作用,并将未加桉树提取物和加了桉树提取物的苯唑西林的抗菌作用进行对比。结果表明,桉树的乙醇提取物和水提取物对 7 种 MRSA 的最小抑菌浓度(MIC)分别为 1~5 g/L 和 2~10 g/L。添加 0.2 g/L 的桉树乙醇提取物之后,苯唑西林对 7 种 MRSA 的 MIC 范围由 62.5~250 mg/L 减小至 7.8~31.3 mg/L,添加 1 g/L 的桉树水提取物之后,苯唑西林对 7 种 MRSA 的 MIC,除了试验菌株 MRSA No. 16 之外,减小至 7.8 mg/L,而 MRSA No. 16 的最小抑菌浓度从 250 mg/L 减小至 62.5 mg/L。试验结果证明了桉树提取物与苯唑西林对 7 种 MRSA 具有良好的协同抑菌效果,采用乳胶凝集法发现,桉树乙醇提取物抑制青霉素结合蛋白 2 (PBP2') 的合成,从而降低 MRSA 对苯唑西林的耐药性。  
**关键词:**桉树;提取物;苯唑西林;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;抗菌作用

**Abstract:** Ethanol and water are used respectively to extract the active ingredients of *eucalyptus* leaves. Then it was researched on the inhibitory effect of the active ingredients on MRSA, and compared the inhibitory effect of the oxacillin with and without *eucalyptus* extracts addition. The results shows that, the ethanol extract of *eucalyptus* presents a minimum inhibitory concentration (MIC) from 1 g/L to 5 g/L for MRSA, and the water extract is from 2~10 g/L. With 0.2

g/L of ethanol extract of *eucalyptus* added, the oxacillin can reduce the MIC of the MRSA from 62.5~250 mg/L to 7.8~31.3 mg/L, and the MIC for all kinds of MRSA reduce to 7.8 mg/L except MRSA NO. 16 which is reduced from 250 mg/L to 62.5 mg/L after adding in 0.1% water extract. The fractional inhibitory concentration (FIC) index method is used to present that the *eucalyptus* extract and oxacillin have good synergic inhibitory effect against MRSA, and latex agglutination is used to find that, ethanol extract of *eucalyptus* inhibit the produce of PBP2' of MRSA and reduce the drug resistance of MRSA on oxacillin.

**Keywords:** *eucalyptus*; extract; oxacillin; MRSA; antibacterial effect

金黄色葡萄球菌是医院内感染的主要病原菌之一,其中以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) 尤为重要<sup>[1]</sup>。随着抗菌药物种类的不断增多及抗菌药物的不合理使用,在临床感染金黄色葡萄球菌的病例中,MRSA 所占的比例越来越高<sup>[2]</sup>。MRSA 的耐药机制复杂,其主要机制是获得编码低亲和力的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)的 *mecA* 基因,从而表现出对甲氧西林、苯唑西林及其他  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药<sup>[3]</sup>。它的多重耐药性给临床诊疗和院内感染控制带来非常大的困难,因此,MRSA 的防治工作十分严峻<sup>[4]</sup>。

桉树叶可以提炼挥发油,具有较强的抗菌、消炎、防腐及杀虫驱蚊等作用,在食品、化工、医药、能源等方面有着广泛的用途。而桉树又是世界上三大速生丰产树种之一<sup>[5]</sup>,因此,桉树叶在抑菌方面具有极大的开发利用潜力。

尽管桉树叶提取物和苯唑西林各自都有着良好的抗菌杀菌作用。但是,怎样降低用药量,提高杀菌效率,鲜有人研究。因此,本研究拟通过比较桉树提取物与苯唑西林对 MRSA 的抗菌作用,探索桉树提取物与苯唑西林的协同作用,及

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31301573);教育部留学回国人员科研基金;中国博士后基金(编号:12M511223);江苏省自然科学基金项目(编号:BK20130493);江苏省教育厅高校自然科学基金(编号:12KJB550002);江苏大学高级人才引进启动基金(编号:11JDG050)

作者简介:崔海英(1979—),女,江苏大学副教授,博士。  
E-mail: cuihaiying@ujs.edu.cn

通讯作者:林琳

收稿日期:2014-12-15

其降低 MRSA 耐药性的作用机制,从而为克服 MRSA 对苯唑西林的耐药性打下基础,也为开发桉树植物抗菌剂提供试验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

供试菌种:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) No. 11、No. 16、No. 23、No. 36、No. 38、B-26、11D1677,由日本广岛大学提供;

苯唑西林:国药集团化学试剂有限公司;

乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

PBP2'胶乳凝集试剂盒:日本 Dekal2Seiken 公司。

#### 1.1.2 培养基

M-H 琼脂培养基:酸水解酪蛋白 17.5 g/L,牛肉浸膏粉 2 g/L,淀粉 1.5 g/L,琼脂 12 g/L。

#### 1.1.3 主要仪器设备

高压蒸汽灭菌锅:MLS-3020 型,鸟取三洋电机(广州)有限公司;

生化培养箱:LRH-250 型,上海恒一科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 相关成分的提取方法

(1) 桉树叶洗净,剪切,烘干,用无水乙醇浸泡提取,桉叶与乙醇质量比例为 1:9,浸泡 48 h。过滤取得滤液,利用旋转蒸发器蒸掉无水乙醇,即得到桉树乙醇提取物<sup>[6]</sup>。

(2) 桉树叶洗净,剪切,烘干,用蒸馏水浸泡加热提取,桉叶与蒸馏水质量比例为 1:9,加热温度为 100 °C,加热 1 h,过滤取得滤液,再用过滤灭菌法将滤液灭菌,得到浓度为 10%的桉树水提取物<sup>[6]</sup>。

1.2.2 桉树提取物对 7 种 MRSA 的 MIC 测定 在无菌的培养皿里加入添加了 40 g/L NaCl 的 M-H 琼脂培养基与桉树乙醇提取物或桉树水提取物,使得桉树乙醇提取物或桉树水提取物的浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 g/L;用划线接种法接种各种前培养的 MRSA,于 35 °C 静止培养 48 h,根据各培养基上划线处是否有明显的细菌生长痕迹来确定 MIC 的浓度。

1.2.3 苯唑西林对 7 种 MRSA 的 MIC 测定 苯唑西林钠一水合物用蒸馏水溶解,溶解浓度为 10 g/L,用过滤灭菌法灭菌。在无菌的培养皿里加入添加了 40 g/L NaCl 的 M-H 琼脂培养基与苯唑西林钠溶液,使苯唑西林的浓度为 31.3、62.5、125.0、250.0、500.0 mg/L。用划线接种法接种各种前培养的 MRSA,于 35 °C 静止培养 48 h,根据各培养基上划线处是否有明显的细菌生长痕迹来确定 MIC 的浓度。

1.2.4 桉树提取物与苯唑西林共同作用对 7 种 MRSA 的抗菌活性 苯唑西林钠一水合物用蒸馏水溶解,溶解浓度为 10 g/L,用过滤灭菌法灭菌<sup>[7]</sup>。在无菌的培养皿里加入添加

了 40 g/L NaCl 的 M-H 琼脂培养基之后,添加苯唑西林钠溶液,使苯唑西林的浓度为 3.9、7.8、15.6、31.3、62.5、125.0、250.0 mg/L,再分别添加 0.2 g/L 的桉树乙醇提取物与 1.0 g/L 的桉树水提取物。用划线接种法接种各种前培养的 MRSA。于 35 °C 静止培养 48 h,根据各培养基上划线处是否有明显的细菌生长痕迹来确定 MIC 的浓度。

1.2.5 利用 FIC index 法测定桉树提取物与苯唑西林对 7 种 MRSA 的协同效应 苯唑西林钠一水合物用蒸馏水溶解,溶解浓度为 10 g/L,用过滤灭菌法灭菌。在无菌的培养皿里加入添加了 40 g/L NaCl 的 M-H 琼脂培养基之后,添加苯唑西林溶液,使苯唑西林的浓度为 3.9、7.8、15.6、31.3、62.5、125.0、250.0 mg/L,再分别添加 0.2 g/L 的桉树乙醇提取物与 1.0 g/L 的桉树水提取物。用划线接种法接种各种前培养的 MRSA。于 35 °C 静止培养 48 h,根据各培养基上划线处是否有明显的细菌生长痕迹来确定 MIC 的浓度。

桉树提取物与苯唑西林的协同效果采用测定分级抑制浓度指数[fractional inhibitory concentration (FIC) index]法来进行评价<sup>[8]</sup>,其计算方法为:

$$FIC\ index = \frac{m_1}{m_2} + \frac{m_3}{m_4} \quad (1)$$

式中:

FIC index——分级抑制浓度指数;

$m_1$ ——并用时桉树提取物的 MIC, g/L;

$m_2$ ——单独使用时桉树提取物的 MIC, g/L;

$m_3$ ——并用时苯唑西林的 MIC, mg/L;

$m_4$ ——单独使用时苯唑西林的 MIC, mg/L。

FIC index  $\leq$  0.5, 协同效果; 0.5 < FIC index  $\leq$  1.0, 相加效果; 1.0 < FIC index  $\leq$  2.0, 无效果; FIC index > 2.0, 拮抗效果。

1.2.6 桉树提取物降低 MRSA 耐药性的作用机制 采用 MRSA 乳胶凝集法探索桉树提取物降低 MRSA 耐药性的作用机制,即使用 PBP2' 胶乳凝集试剂盒来测定 PBP2' 的产生,并采用包被有抗 PBP2a 单克隆抗体的乳胶颗粒与生长于血平板上纯的金黄色葡萄球菌菌落进行凝集试验。即在无菌 M-H 液体培养基里,添加 2.0 g/L 的桉树乙醇提取物与前培养的试验菌,于 35 °C 培养 24 h。培养液用 pH 7 无菌磷酸生理盐水缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)清洗 3 次,再加 200  $\mu$ L 0.1 M NaOH 使沉淀悬浮,其金黄色葡萄球菌的细胞数为 10<sup>9</sup> Cells/200  $\mu$ L,悬浮液加热 3 min,使菌体释放 PBP2',再添加 50  $\mu$ L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,进行离心(3 000 r/min, 5 min)。载玻片上各滴入 50  $\mu$ L 上清液的原液、2 倍、4 倍以及 8 倍稀释液,再添加 25  $\mu$ L 的抗 PBP2' 单克隆抗体搅拌,反应 3 min,观察有没有凝集现象。结果判断根据说明书,分 3+, 2+, +, - 的 4 个层次表示凝集程度。

## 2 结果与分析

### 2.1 桉树提取物对 7 种 MRSA 的 MIC 测定

本试验的桉树提取物对 7 种院内感染病原菌——MR-

表 1 桉树提取物对各种耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌活性

Table 1 Inhibition effect of Eucalyptus Extract against MRSA

提取溶剂	最小抑菌浓度 MIC/%						
	No. 11	No. 19	No. 23	No. 36	No. 38	B-26	11D1677
乙醇	2	2	2	2	2	5	2
水	5	5	5	5	5	5	5

SA 显示了良好的抑菌效果(表 1):桉树乙醇提取物和桉树水提取物对 7 种 MRSA 的 MIC 分别为 2~5 g/L 和 5 g/L,桉树乙醇提取物为佳。

### 2.2 青霉素类抗生素苯唑西林对 7 种 MRSA 的 MIC 测定

由表 2 可知:苯唑西林对 7 种 MRSA 的抑菌浓度范围为 62.5~250.0 mg/L。根据美国临床实验室标准化委员会标准<sup>[9,10]</sup>,苯唑西林 MIC $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$  为耐药,即所有的试验菌对苯唑西林均显示了很强的耐药性。

表 2 苯唑西林对各种耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌活性

Table 2 Inhibition effect of oxacillin against MRSA

试验菌	最小抑菌浓度 MIC/(mg · L <sup>-1</sup> )
No. 11	250.0
No. 16	250.0
No. 23	125.0
No. 36	62.5
No. 38	125.0
B-26	62.5
11D1677	125.0

表 3 桉树乙醇提取物与苯唑西林对 MRSA 的 FIC index<sup>†</sup>

Table 3 FIC index of ethanol extract of eucalyptus in combination with oxacillin of MRSA

试验菌	苯唑西林的 MIC/(mg · L <sup>-1</sup> )					FIC index			
	0(对照)	0.5 g/L	0.2 g/L	0.1 g/L	0.05 g/L	0.5 g/L	0.2 g/L	0.1 g/L	0.05 g/L
No. 11	250.00	0.98	125.00	125.00	250.00	0.25	0.60	0.55	1.03
No. 16	250.00	0.49	62.50	125.00	250.00	0.25	0.35	0.55	1.03
No. 23	125.00	0.49	7.82	7.82	62.50	0.25	0.16	0.11	0.53
No. 36	62.50	0.49	1.95	3.91	15.60	0.26	0.13	0.11	0.28
No. 38	125.00	0.49	3.91	62.50	125.00	0.25	0.13	0.55	1.03
B-26	62.50	0.49	7.82	15.60	31.25	0.11	0.17	0.27	0.51
11D1677	125.00	0.49	31.30	62.50	125.00	0.25	0.35	0.55	1.03

<sup>†</sup> 桉树乙醇提取物对 MRSA 的 MIC 为 2.0 g/L。

### 2.3 桉树提取物与苯唑西林共同作用对 7 种 MRSA 的 MIC

由图 1 可知,苯唑西林对 7 种 MRSA 的最小抑菌浓度范围为 62.5~250.0 mg/L,而添加 0.02% 的桉树乙醇提取物之后,苯唑西林对 7 种 MRSA 的最小抑菌浓度范围减小至 7.8~31.3 mg/L,添加 0.1% 的桉树水提取物之后,苯唑西林对 7 种 MRSA 的最小抑菌浓度范围,除了试验菌株 MRSA No. 16,均减小至 7.8 mg/L,而 MRSA No. 16 的最小抑菌浓度从 250.0 mg/L 减小至 62.5 mg/L,以上结果,充分证明桉树乙醇提取物与水提取物明显减小 MRSA 对苯唑西林的耐药性,二者显示了良好的协同效果。

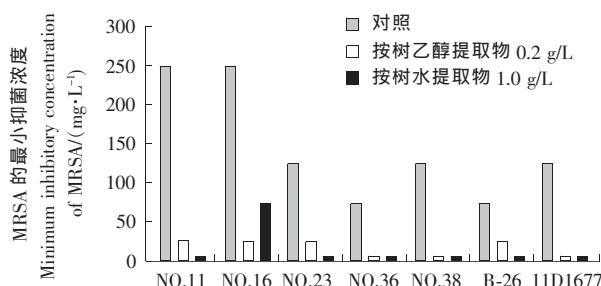


图 1 桉树提取物与苯唑西林共同作用对 7 种 MRSA 的 MIC

Figure 1 MIC of eucalyptus extract in combination with oxacillin of MRSA

### 2.4 利用 FIC index 法测定桉树提取物与苯唑西林对 7 种 MRSA 的协同效应

由表 3 可知,添加 0.05% (1/4 MIC) 的桉树乙醇提取物,可使苯唑西林的最小抑菌浓度范围从 62.5~250.0 mg/L 降低至 0.49~0.98 mg/L,其分级抑制浓度指数为 0.11~0.26,即小于 0.5,显示了协同效应,添加 0.2 g/L (1/10 MIC) 的桉树乙醇提取物时,分级抑制浓度指数为 0.13~0.60,除 No. 11 之外均显示了良好的协同效应。同样,如表 6 所示,

表 4 桉树水提取物与苯唑西林对 MRSA 的 FIC index<sup>†</sup>

Table 4 FIC index of water extract of eucalyptus in combination with oxacillin of MRSA

试验菌	苯唑西林的 MIC / (mg · L <sup>-1</sup> )					FIC index			
	0(对照)	1.0 g/L	0.5 g/L	0.2 g/L	0.1 g/L	1.0 g/L	0.5 g/L	0.2 g/L	0.1 g/L
No. 11	250.00	15.60	62.50	250.00	250.00	0.26	0.35	1.04	1.02
No. 16	250.00	1.95	62.50	250.00	250.00	0.21	0.35	1.04	1.02
No. 23	125.00	1.95	7.82	125.00	125.00	0.22	0.16	1.04	1.02
No. 36	62.50	0.49	1.95	62.50	62.50	0.21	0.13	1.04	1.02
No. 38	125.00	0.49	7.82	125.00	125.00	0.20	0.16	1.04	1.02
B-26	62.50	3.91	3.91	62.50	62.50	0.26	0.16	1.04	1.02
11D1677	125.00	7.82	62.50	125.00	125.00	0.26	0.60	1.04	1.02

<sup>†</sup> 桉树水提取物对 MRSA 的 MIC 为 5.0 g/L。

添加 1.0 g/L(1/5 MIC)和 0.5 g/L(1/10 MIC)的桉树水提取物时,其分级抑制浓度指数分别为 0.20~0.26,0.13~0.60,显示了良好的协同效应。

### 2.5 桉树提取物降低 MRSA 耐药性的作用机制

由表 5 可知,对 7 个供试菌株,对照样品均显示了很强

的凝集反应。添加 2 g/L 桉树乙醇提取物的样品,从原液到稀释至 8 倍,均显示了较弱的凝集反应。PBP2'(penicillin-binding protein2)是葡萄球菌中的肽聚糖合成酶,是一种青霉素结合蛋白 2(PBP2'),该蛋白的存在是细菌对 β-内酰胺类耐药的主要根源。

表 5 桉树乙醇提取物对 MRSA 产 PBP2' 的影响

Table 5 Impact of ethanol extract of eucalyptus on the produce of PBP2' of MRSA

稀释 梯度	No. 11		No. 16		No. 23		No. 36		No. 38		B-26		11D1677	
	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组
×1	3+	1+	3+	1+	3+	1+	3+	1+	3+	2+	3+	2+	3+	1+
×2	3+	1+	3+	1+	3+	1+	3+	1+	3+	1+	3+	1+	3+	1+
×4	2+	-	3+	1+	3+	-	3+	-	3+	1+	2+	-	3+	1+
×8	2+	-	2+	-	2+	-	2+	-	2+	-	2+	-	2+	-

### 3 结论

本试验通过对比桉树提取物与苯唑西林对 7 种 MRSA 的抗菌效果,发现桉树提取物显示了更好的抗菌效果,其中桉树的乙醇提取物,比水提取物具有更强的抗菌效果。而加入桉树提取物的苯唑西林能够明显减弱 MRSA 对其耐药性,试验也接着证明了桉树提取物与苯唑西林确实有着良好的协同作用。

桉树提取物降低 MRSA 耐药性的作用机制是桉树提取物抑制青霉素结合蛋白 2(PBP2')的合成,从而降低 MRSA 对苯唑西林的耐药性。这为 MRSA 的临床诊疗和院内感染控制提供了新的途径,同时也为桉树植物类抗菌剂开辟了新的应用领域。

#### 参考文献

- 李元君,余良芳,王东杰. 178 株金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(7): 1468~1469.
- 李兴德,宋沧桑,杨艳. 我院 2009~2011 年铜绿假单胞菌与耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对常用抗菌药物的耐药性变迁情况研究[J]. 中国药房, 2013, 24(10): 894~898.
- 薛黎明,季伟,王宇清. 2006~2009 年苏州地区儿童呼吸道感染

- 金黄色葡萄球菌耐药性分析[J]. 儿科学杂志, 2011, 17(3): 41~43.
- 王珊,齐慧敏,张再红,等. 苯唑西林诱导金黄色葡萄球菌形成 L 型研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26(7): 502~505.
- 刘宇珍,张朝如. 桉叶油及其包合物的抗菌作用研究[J]. 卫生职业教育, 2011, 29(6): 114~115.
- 吴青业,关业枝,张清民,等. 两种方法提取桉树叶挥发油成分的比较研究[J]. 中药材, 2011, 10(8): 1346~1349.
- 钱昆,周涛. 植物香辛料复配抑菌效果的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 93~96.
- 吴菲,王小莺,韩晓萍. 三种抗菌药物对大肠杆菌和胸膜肺炎放线杆菌 MIC 值及 FIC 指数的测定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, 3(3): 137~138.
- Manu Chaudhary, Shailesh Kumar, Renu Bansal. Anurag payasi synergy of a novel antibiotic adjuvant entity against multi drug resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Pharmacy Research, 2013, 7(9): 781~786.
- 陈民钧. 美国临床实验室标准化委员会 2004 年版有关药敏试验标准化更新要点[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9): 1055~1057.