

• 论 著 •

云南白药对金黄色葡萄球菌溶血现象和血浆凝固能力的影响*

周 湧, 黄少隆, 王杰敏, 杨卫东, 江俊兵
(东莞市第五人民医院检验科, 广东东莞 523905)

摘要:目的 研究云南白药对金黄色葡萄球菌溶血现象和血浆凝固能力的影响,以抗毒力为立足点探讨云南白药的新作用。方法 取金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC29213)配制为 0.5 麦氏浊度单位(MCF)的菌液分别点种于含不同浓度云南白药的血琼脂平板中,37℃培养 24 h 后观察并测量溶血环直径。取不同浓度药液作用后的金黄色葡萄球菌配制成 0.1 MCF 的菌液分别取 20 μL 加于 80 μL 的血浆中,37℃培养 24 h,观察凝固现象。结果 4 种浓度药液对金黄色葡萄球菌溶血环的影响有明显差异($P < 0.05$),溶血环直径随药物浓度的增加而减小;对血浆的凝固作用影响不明显且没有规律性,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 云南白药可以抑制金黄色葡萄球菌的生长和溶血能力,但对血浆凝固酶的作用不明显。

关键词:金黄色葡萄球菌; 中药; 溶血素; 血浆凝固酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)17-2476-02

Effects of Yunnan Baiyao on the hemolytic phenomena and plasma clotting ability of *Staphylococcus aureus**

Zhou Yong, Huang Shaolong, Wang Jieming, Yang Weidong, Jiang Junbing

(Department of Clinical Laboratory, the Fifth People's Hospital of Dongguan, Guangdong 523905, China)

Abstract: **Objective** To Study the effect of Yunnan Baiyao on the hemolysis and plasma coagulation ability of *Staphylococcus aureus*. To seek new mechanism of Yunnan Baiyao's application on the basis of anti-virulence. **Methods** 0.5 MCF bacteria liquid of *Staphylococcus aureus* standard strains(ATCC29213) were prepared and cultured in blood agar plates which containing Yunnan Baiyao of different concentrations at 37℃ for 24 h. Then the diameter of hemolysis rings were measured and recorded. 0.1 MCF bacteria liquids treated with Yunan Baiyao of different concentrations were prepared, and 20 μL of the bacteria liquid were added into 80 μL plasma, then cultivated at 37℃ for 24 h to observe the phenomenon of solidification. **Results** There was significant difference among the effects of Yunan Baiyao of different concentrations on the *Staphylococcus aureus* hemolytic rings($P < 0.05$), and the drug concentrations inversely proportional to the diameter of hemolysis. Plasma coagulation effect of bacteria was not obvious different after the treatment with different concentrations of Yunnan Baiyao, and not had any regular pattern($P > 0.05$). **Conclusion** Yunnan baiyao can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and its hemolytic ability but has no significant effect on plasma clotting enzyme.

Key words: *Staphylococcus aureus*; traditional Chinese medicine; hemolysin; plasma coagulase

金黄色葡萄球菌,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、多重耐药菌株所导致的感染死亡人数不断增加^[1],传统抗菌药物治疗已经难以应对日益严峻的挑战^[2],这迫使研究人员必须努力寻求新型的抗菌药物。云南白药是我国最著名的中药之一,由多种中草药植物组合而成^[3],即使不需要无菌条件保存,直接将其涂抹于伤口上也无需担心引起感染。因此,笔者推测,云南白药可能具有抑制金黄色葡萄球菌毒力的作用。本研究通过观察云南白药对金黄色葡萄球菌溶血现象和血浆凝固现象的影响,探讨了云南白药与金黄色葡萄球菌毒力表达间的内在联系。

1 材料与方法

1.1 材料 金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC29213);云南白药为云南白药集团股份有限公司生产;哥伦比亚血琼脂培养基购自广州迪景微生物科技有限公司;无菌注射用水为安徽双鹤药业有限责任公司产品;卡尺(浙制 01010235 号);人血浆由本研究的志愿者提供。

1.2 方法

1.2.1 取 80 g 云南白药(药粉)溶于 500 mL 的无菌水注射用水中,放于摇床上振荡,24 h 后离心取上清液,此时上清液浓度为 16%。将 16% 的药液分别配制为 8%、4%、2% 的药液备用。

1.2.2 取 5 个 9 cm 血平板,编号 1~5。将 16%、8%、4%、2% 的药液各取 200 μL 加于 1~4 号平板上,5 号平板加 200 μL 无菌注射用水,用无菌棉签涂布均匀,待干。

1.2.3 金黄色葡萄球菌 ATCC29213 转种培养 24 h 后,配制为 0.5 麦氏浊度单位(MCF)的菌液。用接种针在 5 个含不同药液浓度血平板上进行点种,24 h 后观察并测量溶血环。重复以上试验 10 次以减少误差。

1.2.4 取试管加入 3 mL 注射用水和 1 mL 血浆,配成 1:4 血浆备用。取 5 个不同浓度药液作用的金黄色葡萄球菌分别用 0.1 MCF 的菌液加 20 μL 于备用血浆中,37℃温育 24 h,观察凝固现象,测凝固物的高度。重复以上试验 10 次以减少误差。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 云南白药对金黄色葡萄球菌溶血环直径的影响 不同浓度的云南白药药液对金黄色葡萄球菌的溶血作用效果不同。16%、8%、4%、2%、0% 的药液作用后的溶血环直径分别为(2.97±0.39)、(5.00±0.53)、(6.03±0.25)、(6.51±0.25)、(7.15±0.30)mm,见表 1。在 16% 的药液作用下,基本上不出现溶血环,溶血直径为菌落直径。随着药液浓度的下降,溶血

* 基金项目:东莞市科技局科研项目(201310515000270)。 作者简介:周湧,男,副主任技师,主要从事临床检验基础研究。

环随之增大,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 不同浓度云南白药作用后金黄色葡萄球菌的溶血环直径 (mm, $\bar{x}\pm s$)

药物浓度(%)	药液作用后溶血环直径
0	7.15±0.30
2	6.51±0.25
4	6.03±0.25
8	5.00±0.53
16	2.97±0.39

2.2 云南白药对金黄色葡萄球菌血浆凝固物高度的影响 在不同浓度的云南白药药液作用下,金黄色葡萄球菌对血浆凝固现象的影响没有一定的规律性,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 不同浓度云南白药作用后金黄色葡萄球菌的血浆凝固物高度 (mm)

试验编号	不同浓度云南白药作用后的血浆凝固物高度				
	0%	2%	4%	8%	16%
1	10.12	9.33	9.94	9.48	8.99
2	9.23	9.56	8.95	9.68	8.85
3	9.28	9.26	9.26	9.27	9.18
4	9.84	9.26	9.48	9.56	9.45
5	9.26	9.33	9.67	9.49	9.76
6	9.55	9.25	9.34	9.58	9.48
7	9.15	9.68	9.58	9.47	9.16
8	9.10	9.15	9.70	9.22	9.25
9	10.06	9.48	9.59	9.10	9.48
10	10.11	9.76	10.06	8.95	9.56

3 讨 论

抗菌药物是目前临床治疗细菌感染的首选方法,但易导致耐药菌的产生。毒力是细菌致病的前提,但不是细菌生长的必要条件。抑制细菌毒力既能控制细菌感染,又不对细菌生长产生选择压力,从而可以避免引发耐药性的风险,因此被认为是新型抗菌药物研发的主要方向之一^[4]。有研究表明,细菌的大部分毒力都受群体效应(QS)系统调控^[5],通过干扰 QS 的正常调控可能减弱甚至抑制细菌毒力表达,所以 QS 系统抑制剂(QSI)正成为抗菌药物研究领域的一大热点^[6]。研究表明,许多长久以来广泛使用的药用和可食性植物,如田七、石榴和白茅等,被证明能够抑制 QS 系统从而抵抗毒力活性和减弱毒性^[7-8],具有止血、止痛等功效。云南白药是我国最著名的中药之一,由多种中草药植物组合而成^[3],具有活血、消肿的功效,即使不需要无菌条件保存,直接将云南白药涂抹于伤口上也无需担心引起感染。在过去的 100 多年里没有任何资料记载云南白药具有杀菌或抑菌作用。目前,云南白药已广泛用于各种出血证,有少数研究报道云南白药辅助治疗急性痢疾和幽门螺杆菌相关性十二指肠溃疡效果理想^[9-10]。本研究表明,云南白药可能具有抑制 QS 活性并导致 β -溶血素释放减少,但云南白药是如何抑制金黄色葡萄球菌 QS 的活性导致毒力减弱的仍有待进一步探讨。国内已有报道,云南白药治疗后引起溶血反应^[11],云南白药的成分中含有剧毒成分,本研究也发现用云南白药的药液配制血平板时,云南白药本身就具有溶血作用,这也是没有将药液直接溶于琼脂中来配制血平板的原因。

本研究表明,云南白药药液对多金黄色葡萄球菌的溶血能力有着较强的抑制作用,而对其血浆的凝固作用影响较小且没有呈一定的规律性,不同药液浓度间的差别也不明显。这可能是因为金黄色葡萄球的溶血素与凝固酶这两种毒力表达机制不同^[12]。同时,云南白药对多金黄色葡萄球的生长过程也有存在着一定的影响。本研究发现,浓度越高的药液作用下的菌落直径越小,形状扁平多样不规则与正常菌落规整圆形的露滴状有着明显差异。因此笔者推测,虽然云南白药没有直接杀菌的作用,但能在一定情况下导致细菌生长不良。

在 16%药液作用下,菌落没有出现溶血环,只在菌落边缘出现一条透光边,说明在此浓度下金黄葡萄球溶血素的产生受到抑制程度最大。随着浓度的降低,溶血环也随之扩大,2%浓度时菌落形态已经与正常相近,溶血环直径差别最小。而凝固酶试验中,云南白药的作用效果不明显可能因为毒力的表达机制不同,而云南白药并不能干扰这个机制的表达。其次,在药液的作用下,菌落的形态发生了变化,可能对其细胞壁造成了破坏,使得菌落表面变得湿润扁平,在平板上培养过程中凝固酶已经大量的释放出来,释放的量受时间、温度还有药液等诸多因素影响,因此血浆凝固现象没有呈一定的规律性。

参考文献

[1] Song JH, Hsueh PR, Chung DR, et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries; an ANSORP study[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(5): 1061-1069.

[2] Ruiz ME, Guerrero IC, Tuazon CU. Endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; treatment failure with linezolid[J]. Clin Infect Dis, 2002, 35(8): 1018-1020.

[3] 余美琼. 云南白药的现代药理作用及其临床新用途[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(9): 64-65.

[4] Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1): 17-27.

[5] 江启沛. 细菌群体感应效应及其应用研究进展[J]. 河北农业科学, 2009, 13(11): 49-52.

[6] von Bodman SB, Willey JM, Diggle SP. Cell-cell communication in bacteria; united we stand[J]. J Bacteriol, 2008, 190(13): 4377-4391.

[7] Koh KH, Tham FY. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity[J]. Infect Immun, 2011, 44(2): 144-148.

[8] Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 10): 1023-1027.

[9] 张怡, 李兴堂. 云南白药辅助治疗急性菌痢 20 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(1): 60-61.

[10] 黎红光, 李金庚. 云南白药配合抗生素治疗幽门螺杆菌相关性十二指肠溃疡的疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(4): 288-289.

[11] 李美丽, 陈旭阳. 探究云南白药的应用及其不良反应[J]. 医药前沿, 2014(15): 223-224.

[12] 陈菲菲, 狄红霞, 蓝乐夫. 金黄色葡萄球菌重要毒力因子的功能及其抑制剂研究进展[J]. 科学通报, 2013, 58(36): 3743-3752.