



周玉梅, 曾诚, 陶莹, 等. 黄酮类化合物联合恩诺沙星对多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌作用[J]. 中兽医学杂志, 2025, 60(2): 57–68.

ZHOU Y M, ZENG C, TAO Y, et al. Antibacterial activity of flavonoids combined with enrofloxacin against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Traditional Chinese veterinary medicine, 2025, 60(2): 57–68.

黄酮类化合物联合恩诺沙星对多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌作用

周玉梅¹, 曾 诚¹, 陶 莹¹, 顾曦晨¹, 杨露情¹,
苏兰兰¹, 王 鲁², 宋旭琴^{1*}, 杨 剑^{1*}

(1. 贵州大学 动物科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 教育部西南药用生物资源工程研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘要:【目的】旨在评估多种黄酮类化合物与恩诺沙星联合应用对多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌作用, 为恢复多重耐药金黄色葡萄球菌敏感性、减少抗生素使用提供科学依据。【方法】以多重耐药金黄色葡萄球菌、恩诺沙星和黄酮类药物为试验材料, 采用PCR技术分析受试菌的耐药基因, 采用微量稀释法测定12种黄酮类化合物对多重耐药金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC), 并通过棋盘法评估黄酮类化合物与恩诺沙星联合的抑菌浓度指数, 筛选出联合用药效果最显著的组合, 进一步绘制细菌生长曲线观察其抑菌效果; 结合细胞外碱性磷酸酶活性测定、结晶紫染色法和细胞膜渗透透试验, 探究药物对耐药金黄色葡萄球菌的影响; 并通过耐药消除试验观察木犀草素对耐药金黄色葡萄球菌敏感性的恢复作用。【结果】(1)受试菌携带 *sul-2*、*ermA*、*SCCmec II*、*SCCmec III* 和 *PVL* 耐药基因, 木犀草素与恩诺沙星在联合对抗多重耐药金黄色葡萄球菌时能够表现出相加作用, 而其他黄酮类化合物如牡荆素、异牡荆素、染料木素等呈现出无关作用。(2)木犀草素能通过增加碱性磷酸酶渗出 ($P < 0.05$), 降低生物被膜形成能力以及增强细胞渗透性, 破坏细菌细胞壁和细胞膜的完整性, 从而抑制细菌正常繁殖。(3)木犀草素能恢复受试菌对恩诺沙星的敏感性, 受试菌对恩诺沙星的最小抑菌浓度降低至原来的50%, 从而减缓细菌耐药性的产生。【结论】木犀草素与恩诺沙星联合用药对多重耐药金黄色葡萄球菌表现为相加作用, 能通过破坏细菌完整性, 抑制被膜形成, 恢复恩诺沙星对耐药菌的敏感性, 降低耐药水平, 达到减少抗菌药用量的目的。

关键词: 黄酮类化合物; 生长曲线; 金黄色葡萄球菌; 多重耐药; 消减

中图分类号: S853.7; S852.61 文献标志码: A 文章编号: 1003-8655(2025)02-057-12

Antibacterial activity of flavonoids combined with enrofloxacin against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

ZHOU Yumei¹, ZENG Cheng¹, TAO Ying¹, Gu Xichen¹, YANG Luqing¹,
SU Lanlan¹, WANG Lu², SONG Xuqin^{1*}, YANG Jian^{1*}

基金项目: 贵州省基础研究计划(自然科学)面上项目(黔科合基础 MS[2025]586)

Project supported by Guizhou Basic Research Program (Natural Sciences) General Project (Qiankehe Foundation MS[2025]586)

作者简介: 周玉梅, orcid.org/0009-0006-0238-1216, Zhouym3333@qq.com; *通信作者: 杨剑, 副教授, 博士, 主要从事中兽药学研究, orcid.org/0000-0002-9037-0915, cas.jyang@gzu.edu.cn; 宋旭琴, 副教授, 博士, 主要从事兽医药理学及毒理学研究, orcid.org/0000-0002-8671-3161, xqsong@gzu.edu.cn。

©《中兽医学杂志》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 协议

(1.College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2.Southwest Pharmaceutical Bioresource Engineering Research Center of the Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: [Objective] This study aims to systematically evaluate the antibacterial activity of the combined application of multiple flavonoids and enrofloxacin against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, with the objective of restoring bacterial sensitivity and reducing antibiotic usage. [Method] Multidrug-resistant *S. aureus*, enrofloxacin, and flavonoids were used as test materials. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of 12 flavonoids against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* were determined by the microbroth dilution method. The fractional inhibitory concentration index (FICI) of the combination of flavonoids and enrofloxacin was evaluated using the checkerboard method to screen for the combination with the most significant synergistic effect. Bacterial growth curves were constructed to observe the antibacterial effect. Combined with the determination of extracellular alkaline phosphatase (AKP) activity, crystal violet staining and cell membrane permeability test, the effects of the drugs on multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* were explored. In addition, the resistance elimination test was carried out to observe the restoring effect of luteolin on the sensitivity of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. [Result] (1) The tested bacteria carried the drug-resistant and virulence genes including *sul-2*, *ermA*, *SCCmec II*, *SCCmec III* and *PVL*. When combined to combat multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, luteolin and enrofloxacin showed an additive effect, while other flavonoids such as vitexin, isovitexin and genistein exhibited no relevant effect. (2) Luteolin could significantly increase the exudation of alkaline phosphatase ($P < 0.05$), reduce the biofilm-forming ability, enhance cell permeability, damage the integrity of bacterial cell wall and cell membrane, thereby inhibiting bacterial proliferation. (3) Luteolin could restore the sensitivity of the tested bacteria to enrofloxacin, reducing the MIC of enrofloxacin against the tested bacteria by 2 times, and slowing down the development of bacterial drug resistance. [Conclusion] The combination of luteolin and enrofloxacin shows an additive effect against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. This combination disrupts bacterial integrity, inhibits biofilm formation, restores the sensitivity of multidrug-resistant bacteria to enrofloxacin, and reduces the level of drug tolerance, thereby achieving the goal of decreasing the required dosage of antibacterial drugs.

Keywords: flavonoids; growth curve; *Staphylococcus aureus*; multidrug resistance; resistance elimination

【研究意义】在国家“减抗禁抗”政策持续推进的背景下,农业农村部发布了《全国兽用抗菌药使用减量化行动方案(2021—2025年)》^[1],明确要求到2025年实现畜禽养殖抗菌药使用量稳步下降,耐药菌传播得到有效遏制。作为我国南方重要的畜禽养殖基地之一,贵州地区大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等常见病原菌的耐药率持续上升。王宏海等^[2]的监测数据显示,耐药金黄色葡萄球菌对青霉素的耐药率高达86.26%~100%,而对万古霉素、利奈唑胺和替加环素则保持较高的敏感率(94.44%~100%)。在此形势下,中药因其天然来源、环境友好、靶点多样且不易诱导耐药的优势,逐渐成为恢复耐药菌敏感性、减少抗生素应用的重要研究方向。【前人研究进展】中药及其活性成分在抗耐药细菌方面展现出广阔的应用前景,为畜禽养殖领域抗生素减量与耐药控制提供了新的实践路径。刘金平等^[3]发现五倍子、黄芩等5种中药能够通过促使耐药大肠杆菌丢失 *rmtB* 基因,使氨基糖苷类药物的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)从 $>512 \mu\text{g/mL}$ 降低至 $2\sim4 \mu\text{g/mL}$,显示出良好的抗耐药作用。孙盈盈^[4]发现白藜芦醇、黄芩苷和黏菌素三药联合应用能够靶向结合 *mcr-1*,可促使 *mcr-1* 阳性大肠杆菌恢复对黏菌素的敏感性,恢复率高达100%。Huang等^[5]则证实石斛酚在体内外均能有效恢复细菌对黏菌素的敏感性。中药可通过多途径恢复抗生素对耐药菌的敏感性,其机制主要包括抑制耐药相关酶的活性、抑制耐药基因的表达与传播、抑制细菌外排泵活性、调控细菌代谢通路等。例如,研究^[6]发现,血根碱可以与 β -内酰胺酶 BlaZ 结合,从而恢复多重耐药金黄色葡萄球菌对 β -内酰胺类抗生素的敏感性;肖潇等^[7]研究发现,蒲公英、金银花的复方制剂可消除耐药质粒,恢复金黄色葡萄球菌对青霉素、氨苄西林和阿莫西林的敏感度。

此外,张鹏^[8]研究发现中药甘草酸和黄芩苷可抑制多重耐药大肠杆菌的外排泵,恢复耐药菌对抗生素的敏感性;Weng等^[9]研究发现苦参中的槐黄烷酮G和苦参黄素能通过干扰细菌的能量代谢,破坏细菌的正常生理活动,还能靶向细菌膜,破坏膜的合成以及完整性,并抑制细胞壁合成,从而破坏耐药细菌(如耐受甲氧西林的金黄色葡萄球菌)的生理活动。

【本研究切入点】当前,恩诺沙星作为畜牧业中广泛应用的氟喹诺酮类抗菌药物,长期大量使用容易导致耐药性,给畜禽养殖业的疾病防控带来严峻挑战。黄酮类化合物(如黄芩苷、芦丁等)作为中药中的重要活性成分,已被证实具有抗菌、抗炎以及调节细菌耐药相关基因表达等多重生物学活性。然而,黄酮类化合物与恩诺沙星联合应用对多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌作用尚未阐明。【拟解决的关键问题】本研究探讨黄酮类化合物与恩诺沙星联合对耐药金黄色葡萄球菌的抗菌效果。通过阐明二者的相互作用,为开发“中药活性化合物+抗生素”低剂量的用药策略,减少恩诺沙星在畜牧业中的使用量,延缓耐药性的发展,有效防控畜禽耐药菌感染提供理论依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株来源

多重耐药金黄色葡萄球菌分离自奶牛场奶牛乳头,由贵州大学兽医药理实验室保藏提供,编号为GY-M140120,分离时间为2014年2月25日。该菌株经分离鉴定后,对磺胺二甲嘧啶、土霉素、头孢噻吩和恩诺沙星等多种抗菌药均呈耐药性^[10]。

1.1.2 试验药物试剂与仪器

抗菌药物:恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)、氧氟沙星(ofloxacin, OFX)、头孢噻吩(ceftiofur, CEF)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、苯唑西林钠(oxacillin sodium, OXA)(大连美仑生物科技有限公司);黄酮类化合物:木犀草素(luteolin, Lut)、槲皮素(quercetin, QR)、芦丁(rutoside, Rutin)、牡荆素(vitexin, VIT)、异牡荆素(isovitexin, IVX)(四川省维克奇生物科技有限公司);染料木素(genistein, GEN)、鹰嘴豆芽素A(Biochanin A, BCA)、大豆黄酮(daidzein, DZ)、千金藤素(cepharanthine, CEP)、杨梅素(myricetin, MYR)、山奈酚(kaempferol, KAE)、芹菜素(apigenin, API)(上海源叶生物科技有限公司);试剂:甘露醇氯化钠琼脂培养基(广东环凯微生物科技有限公司);MH(B)肉汤培养基(北京奥博星生物技术有限公司);碱性磷酸酶(AKP)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

洁净工作台YJ型,苏州苏信净化设备厂;水浴恒温振荡器SC-300JA,常州华普达教学仪器有限公司;电子天平JA5003N型,上海菁海仪器有限公司;电热恒温培养箱,上海贺德实验设备有限公司;细菌浊度仪,杭州齐威仪器有限公司;酶标仪,杭州齐威仪器有限公司;PCR扩增仪,杭州齐威仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 最小抑菌浓度(MIC)

采用微量肉汤稀释法检测多重耐药金黄色葡萄球菌对恩诺沙星、头孢噻吩等5种抗生素和12种黄酮类化合物的最小抑菌浓度,参考康艳华等^[6]的方法进行测定,具体过程如下:在96孔板上,采用倍比稀释法,用无菌MH(B)液体培养基配制系列浓度梯度的药液,每孔加入50 μ L;空白对照组的每孔加入50 μ L无菌MH(B)培养基。最后,往所有操作孔中加入50 μ L菌悬液(1.5×10^6 CFU/mL),盖紧96孔板,37 $^{\circ}$ C恒温培养24 h后观察结果,以无肉眼可见细菌生长的最低药物浓度判定为该药对测试菌株的MIC,每组至少重复3次。同时,对所有药物进行溶解度测定,并设置溶剂对照组,包括1%DMSO、5%甲醇、0.5%冰醋酸共3组。

1.2.2 恩诺沙星与黄酮类化合物作用关系

参考吴雪娇等^[11-12]的方法,采用棋盘格法测定恩诺沙星分别与木犀草素、槲皮素和大豆黄酮等12种黄酮类化合物联合应用对多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌效果。将不同浓度的2种药液进行组合,使各孔中每种药液的最终浓度分别为8 $\times$ MIC、4 $\times$ MIC、2 $\times$ MIC、MIC、1/2 $\times$ MIC、1/4 $\times$ MIC和1/8 $\times$ MIC。35 $^{\circ}$ C恒温培养24 h后观察结果,以无肉眼可见细菌生长的最低药物浓度判定为两药对测试菌株的联合MIC,联合用药的抑菌浓度指数(FICI)的计算公式为:

$$FICI = \frac{MIC_{A药联合}}{MIC_{A药单独}} + \frac{MIC_{B药联合}}{MIC_{B药单独}} \quad (1)$$

式(1)中:MIC_{A药联合}和MIC_{B药联合}分别为A药和B药联合使用时各自在最低抑菌浓度组合中的浓度;MIC_{A药单独}和MIC_{B药单独}分别为A药和B药单独使用时的最低抑菌浓度;A药为Lut、QR、Rutin、VIT、IVX、GEN、BCA、DZ、CEP、MYR、KAE、API,B药为ENR。联用效果的判定标准为:FICI≤0.5为协同作用;0.5<FICI≤1为相加作用;1<FICI≤4为无关作用;FICI>4为拮抗作用。

1.2.3 单药及联合药物对多重耐药金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

参考马彦军^[13]的试验方案,本试验分为阳性对照组、试验组(含2×MIC~1/8×MIC)和阴性对照组。阳性对照组为一横排每个孔加入MH(B)液体培养基和1.5×10⁶ CFU/mL菌液各100 μL;阴性对照组为一横排每个孔加入MH(B)液体培养基200 μL;试验组为在含MH(B)培养液中分别加入调好的1%菌液和对应药液各100 μL。37℃、180 r/min振荡培养24 h,每2 h无菌取样1次,用酶标仪测定OD_{600 nm}并进行记录。每次试验至少重复3次,试验组结果取3次重复试验的平均值。以时间为横坐标(*x*),OD_{600 nm}为纵坐标(*y*),不扣除空白孔吸光度绘制多重耐药金黄色葡萄球菌的生长曲线,分析不同浓度药物对菌株生长的影响。

1.2.4 胞外碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)测定

阴性对照组、恩诺沙星单药组和联合用药组(1/2×MIC的恩诺沙星分别联合1/2×MIC、1/4×MIC和1/8×MIC的木犀草素)中各加入1 mL菌液(1.5×10⁶ CFU/mL),置于37℃水浴摇床中培养12 h,随后4 000 r/min离心10 min。随后,参考碱性磷酸酶试剂盒说明书进行相应操作,测定其在520 nm处的吸光度,并根据说明书上的公式计算AKP值并作图。其中,AKP计算公式如下:

$$AKP活力 = \frac{A_{测定} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \times 100 \times N \quad (2)$$

式(2)中:*A*_{测定}是待测样本(细菌培养上清液)的吸光度值;*A*_{空白}是双蒸水的吸光度值;*A*_{标准}是0.1 mg/mL酚标准溶液的吸光度值;*C*_{标准}是酚标准溶液的浓度,为0.1 mg/mL;*N*是稀释倍数。

1.2.5 耐药基因的测定

使用水煮法提取多重耐药金黄色葡萄球菌的DNA,12 000 r/min离心后弃上清,用ddH₂O重复洗涤,再煮沸,随后离心获取DNA模板。按照ddH₂O 9.5 μL、Mix 12.5 μL、DNA模板2 μL、上下游引物各0.5 μL添加反应体系,参考张伟^[14]的方法,分别采用PVL、SCCmec II、SCCmec III、*ermA*、*Sul-2*的特异性引物进行扩增。扩增程序为预变性94℃ 5 min;随后进行30个循环:94℃ 30 s(变性)、55℃ 30 s(退火)、72℃ 50 s(延伸),最后72℃延伸5 min进行DNA扩增。以5 μL Marker作为对照,经120 V电泳36 min后进行凝胶成像。特异性引物见表1。

表1 设计引物的碱基序列、长度及退火温度

Tab.1 Base sequence,length and annealing temperature of designed primers

引物名称 Primer name	碱基序列 Nucleotide sequence	长度/bp Length	退火温度/℃ Annealed temperature
PVL	F: ATCATTAGGTA AAAATGTCTGGACATGATCCA	433	55
	R: GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAAGC		
SCCmec II	F: CGTTGAAGATGATGAAGCG	398	55
	R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
SCCmec III	F: CCATATTGTGTACGATGCG	280	55
	R: CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG		
<i>ermA</i>	F: TACCACCACTATATTTTCATCCTA	136	55
	R: TATTCACGGTTTACCCACTTAT		
<i>Sul-2</i>	F: CGGCATCGTCAACATAACC	722	55
	R: GTGTGCGGATGAAGTCAG		
16S rDNA	F: TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA	158	55
	R: TGCGGGACTTAACCCAACA		

1.2.6 细菌生物被膜的测定

阴性对照组、恩诺沙星单药组和联合用药组(1/2×MIC的恩诺沙星分别联合1/2×MIC、1/4×MIC和1/8×MIC的木犀草素)中各加入100 μL 1.5×10⁶ CFU/mL菌液,总体积为200 μL,37℃恒温静置24 h^[15]。培养完成后,依次进行95%甲醇固定、0.1%结晶紫染色、洗涤3次、95%乙醇溶解等操作,温育5 min后,测定其在595 nm处的吸光度,并依照说明书上的公式计算生物膜抑制率并作图,计算公式如下:

$$\text{生物膜抑制率} = \frac{\text{对照组生物膜形成量} - \text{试验组生物膜形成量}}{\text{对照组生物膜形成量}} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.7 细胞膜渗透试验

参考马毛毛^[16]的试验方法,PI染料用1 mL的ddH₂O进行溶解,取100 μL溶解后的染料加入900 μL的PBS缓冲液中。将1.5×10⁶ CFU/mL的菌液于4 000 r/min离心5 min;弃上清后加入0.01 mol/L的PBS重悬悬液,调整OD_{600 nm}至0.5;向96孔板中每孔加入170 μL菌液,再加入20 μL 100 nmol/L的PI染料,使最终PI为10 nmol/L,37℃孵育30 min,测量荧光值,孵育完成后加入不同浓度药物,继续37℃孵育30 min。随后,使用酶标仪在37℃条件下,选择激光波长535 nm,发射波长615 nm,测定相对荧光强度。

1.2.8 耐药性消除测定

参考马彦军^[13]的方法,在试管中分别加入1.5 mL MH(B)液体培养基、0.5 mL木犀草素药液(1/2×MIC)和100 μL 1.5×10⁶ CFU/mL的多重耐药金黄色葡萄球菌菌液,在37℃水浴摇床中刺激培养24 h,按上述方式连续刺激培养4代。取最后一代刺激培养后的菌液,调节至1.5×10⁶ CFU/mL,比较刺激前后2种药物对受试菌MIC的变化。

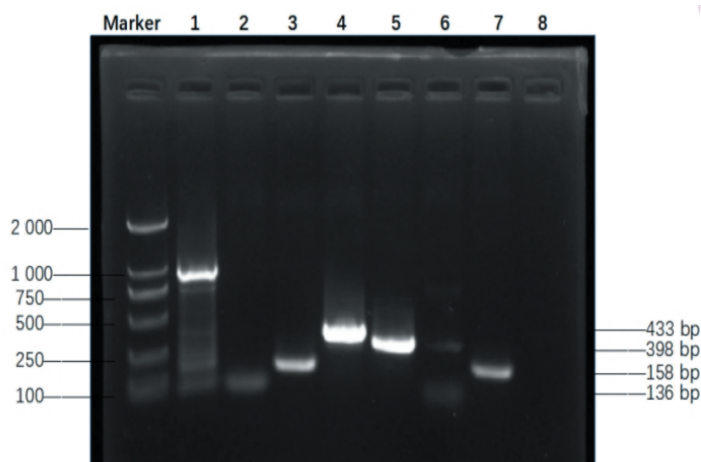
1.3 统计分析

采用SPSS 25.0软件进行统计分析,数据均以平均值±标准差(mean±SD)表示。胞外碱性磷酸酶活性、生物被膜形成能力及细胞膜通透性数据均采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并以Tukey's HSD法进行事后多重比较。显著性水平设定为P<0.05,极显著性水平为P<0.01。

2 结果与分析

2.1 受试菌耐药基因测定

利用16S rRNA基因特异性引物扩增后,得到的目的条带大小介于100~1 000 bp,从左到右依次为*sul-2*、*ermA*、*SCCmec III*、*PVL*、*SCCmec II*、未检测出耐药基因、16S rDNA(图1),符合金黄色葡萄球菌多重耐药标准。



Marker:DL2000;1:*sul-2*;2:*ermA*;3:*SCCmec III*;4:*PVL*;5:*SCCmec II*;6:未检测出耐药基因;7:16S rDNA;8:未上样。

Marker:DL2000;1:*sul-2*;2:*ermA*;3:*SCCmec III*;4:*PVL*;5:*SCCmec II*;6:No drug resistance genes were detected;

7:16S rDNA;8:Unloaded well.

图1 多重耐药金黄色葡萄球菌耐药基因PCR扩增电泳

Fig.1 PCR amplification electrophoresis map of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* resistance genes

2.2 抗菌药和黄酮类化合物最低抑菌浓度(MIC)测定结果及溶解度影响分析

5种抗菌药和12种黄酮类化合物通过微量肉汤稀释法测定对多重耐药金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度结果如表2所示。5种抗菌药对受试菌均表现为耐药,其中恩诺沙星的MIC为8 μg/mL;黄酮类化合物中木犀草素、槲皮素、鹰嘴豆芽素A、山奈酚和芹菜素对受试菌抗菌效果较好,而其他化合物抗受试菌所用药量较大,其MIC均大于1 000 μg/mL。溶剂对照组结果均显示其与空白对照组的菌株生长情况无显著差异($P>0.05$),证明所用溶剂浓度对抑菌试验无明显干扰。

表2 抗菌药和黄酮类化合物在MH(B)肉汤中的溶解度和对多重耐药金黄色葡萄球菌的MIC
Tab.2 MIC of antibiotics and flavonoids against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and solubility in MH(B)broth

名称 Drug/Compound name	培养基中最大溶解度/(μg·mL ⁻¹) Maximum solubility in the culture medium	MIC/(μg·mL ⁻¹)
恩诺沙星 Enrofloxacin,ENR	5 120	8
氧氟沙星 Ofloxacin,OFX	5 120	16
头孢噻呋 Ceftiofur,CEF	5 120	8
环丙沙星 Ciprofloxacin,CIP	5 120	16
苯唑西林钠 Oxacillin sodium,OXA	5 120	8
木犀草素 Luteolin,Lut	8 000	125
槲皮素 Quercetin,QR	5 120	320
牡荆素 Vitexin,VIT	8 000	4 000
芦丁 Rutoside,Rutin	4 000	1 000
异牡荆素 Isovitexin,IVX	8 000	2 000
大豆黄酮 Daidzein,DZ	5 120	2 000
染料木素 Genistein,GEN	8 000	8 000
鹰嘴豆芽素A Biochanin A,BCA	5 120	125
千金藤 Cepharanthine,CEP	10 000	2 000
杨梅素 Myricetin,MYR	5 120	2 000
山奈酚 Kaempferol,KAE	5 210	160
芹菜素 Apigenin,API	5 210	160

溶解度<MIC的化合物,其由溶解度限制导致;溶解度≥MIC的化合物,其表示无明显抑菌活性。
Compounds with solubility less than MIC, which are caused by solubility limitations; Compounds with solubility be equal or more than MIC indicate no obvious antibacterial activity.

2.3 黄酮类化合物与恩诺沙星的联合抗菌作用

选择对受试菌抗菌作用较好的木犀草素、槲皮素、鹰嘴豆芽素A、山奈酚、芹菜素、芦丁和牡荆素与恩诺沙星联合,研究不同组合的联合抗菌作用。结果如图2所示,仅恩诺沙星与木犀草素联合时表现出相加作用,其他黄酮类化合物与恩诺沙星联合应用均表现为无关作用。

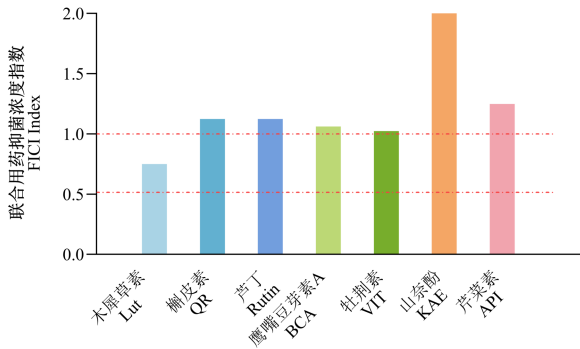


图2 7种黄酮类化合物联合恩诺沙星对多重耐药金黄色葡萄球菌的FICI
Fig.2 FICI of 7 flavonoids combined with enrofloxacin against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

2.4 不同药物组合对多重耐药金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

恩诺沙星与木犀草素单独或联合作用对生长曲线的影响如图 3 所示。对照组均表现出典型的 S 型生长曲线,在 2~8 h 内进入对数生长期。恩诺沙星单药组在 2×MIC 和 1×MIC 浓度下均能有效抑制细菌生长,而在 1/2×MIC 浓度下细菌缓慢生长。当 1/2×MIC 恩诺沙星联合 1/8×MIC 的木犀草素时,对受试菌呈现抑制作用;当 1/2×MIC 恩诺沙星联合 1/2×MIC 的木犀草素时,在 24 h 内对受试菌均表现出显著的生长抑制作用,且随着木犀草素浓度增加,抗菌作用显著增强。

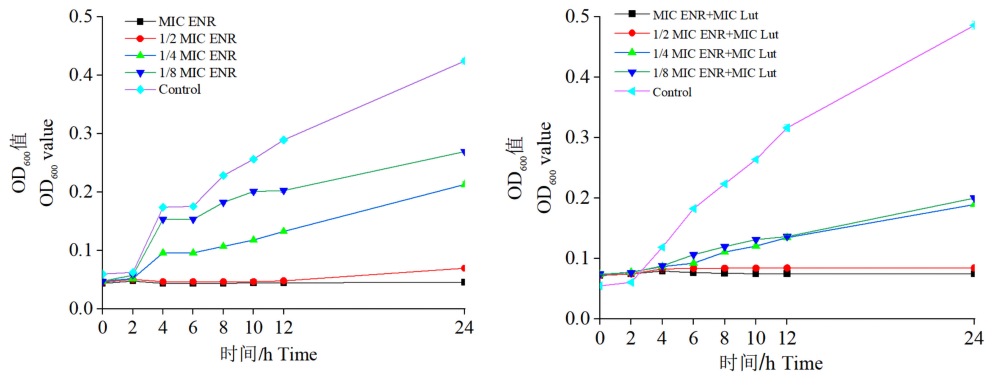
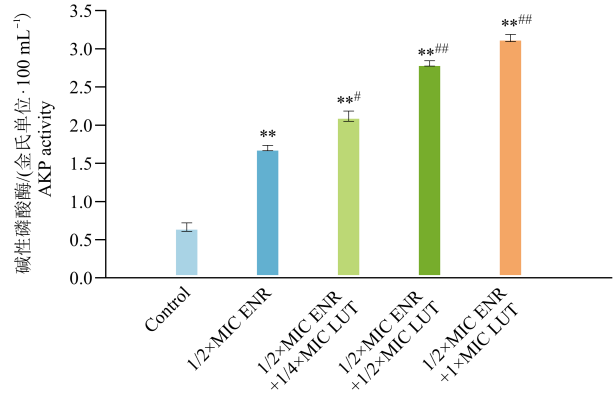


图 3 不同药物组合对耐药金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

Fig.3 The effect of different drug combinations on the growth curve of drug-resistant *Staphylococcus aureus*

2.5 木犀草素联合恩诺沙星对受试菌胞外碱性磷酸酶的影响

木犀草素联合恩诺沙星对受试菌胞外碱性磷酸酶的影响结果如图 4 所示,对照组细菌细胞外 AKP 水平约为 0.5 Kings/100 mL,试验组 AKP 水平均极显著高于对照组($P<0.01$);加入木犀草素后,除 1/4×MIC 的木犀草素联合用药组与恩诺沙星单药组呈差异显著外($P<0.05$),其余联合用药组均极显著高于恩诺沙星单药组($P<0.01$),且呈显著的浓度依赖性。



试验组与对照组差异极显著(**, $P<0.01$),联合用药组与单药组差异显著(#, $P<0.05$),联合用药组与单药组差异极显著(##, $P<0.01$)。

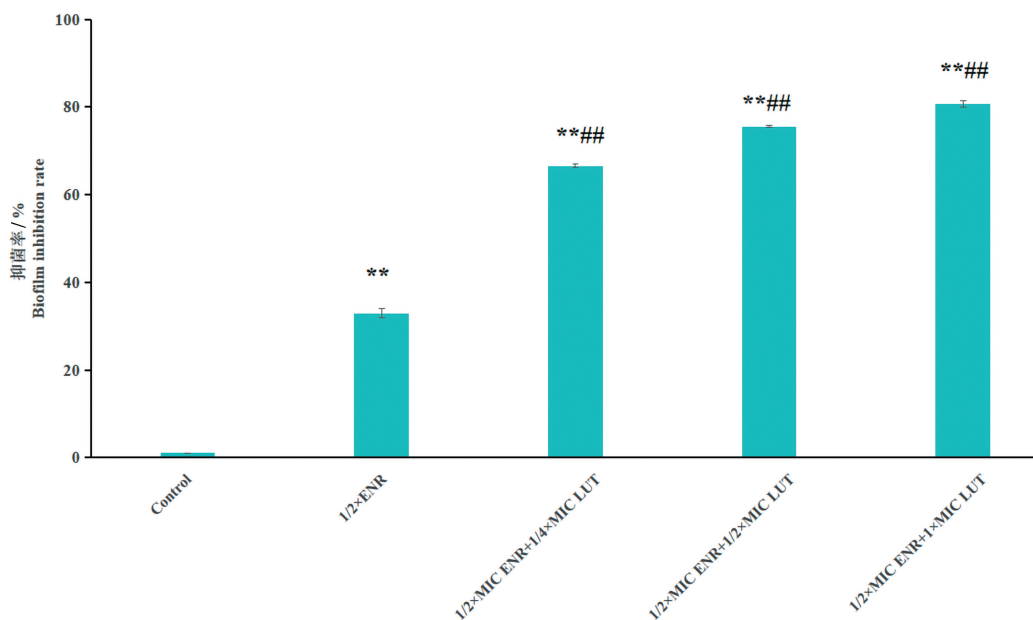
There was an extremely significant difference between the experimental group and the control group (**, $P<0.01$), a significant difference between the combination medication group and the single-drug group (#, $P<0.05$), and a significant difference between the combination medication group and the single-drug group (##, $P<0.01$).

图 4 木犀草素联合恩诺沙星对多重耐药金黄色葡萄球菌碱性磷酸酶的影响

Fig.4 The effect of luteolin combined with enrofloxacin on alkaline phosphatase of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

2.6 木犀草素联合恩诺沙星对受试菌生物被膜形成的影响

木犀草素联合恩诺沙星对多重耐药金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响结果如图 5 所示,恩诺沙星单药和恩诺沙星-木犀草素联合用药均能极显著抑制受试菌生物被膜的形成($P<0.01$),1/2×MIC 恩诺沙星联合 1/4×MIC 的木犀草素与单独使用恩诺沙星相比具有显著差异($P<0.01$),且随着木犀草素浓度的增加,细菌生物被膜抑制程度逐渐加强。



试验组与对照组差异极显著(**, $P < 0.01$), 联合用药组与单药组差异极显著(##, $P < 0.01$)。

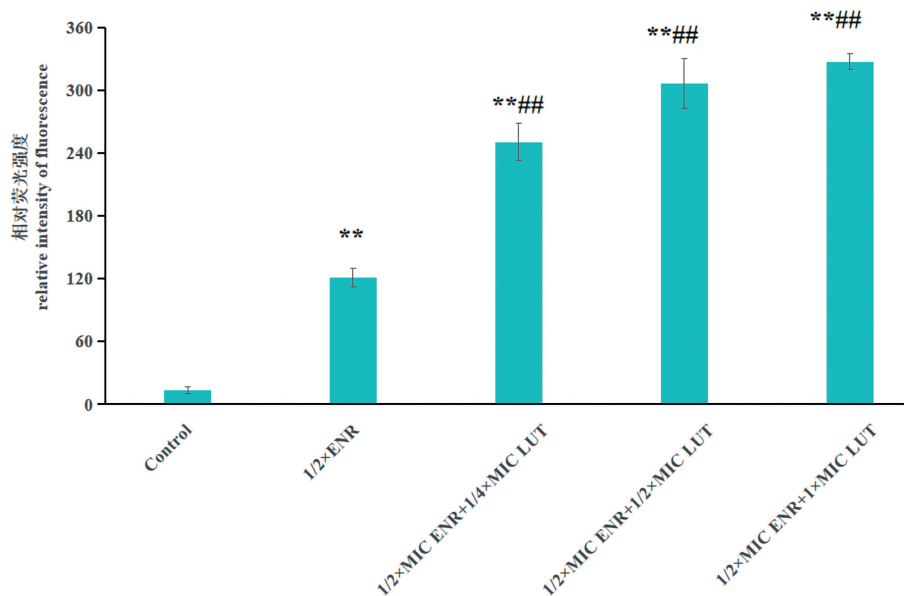
There was an extremely significant difference between the experimental group and the control group (**, $P < 0.01$), and a significant difference between the combination medication group and the single-drug group (##, $P < 0.01$).

图5 恩诺沙星和恩诺沙星-木犀草素联合用药对生物膜的抑制作用

Fig.5 Inhibitory effects of enrofloxacin, luteolin, and their combination on biofilm formation

2.7 细胞膜渗透试验

PI染料仅能通过受损的细胞膜与细菌DNA结合,其荧光强度与细胞膜通透性呈正相关,可反映膜的损伤程度。本研究测定恩诺沙星单药及其与不同浓度木犀草素联合对多重耐药金黄色葡萄球菌细胞膜的影响,结果如图6所示,与恩诺沙星单药组相比,加入1/4×MIC木犀草素可显著增强恩诺沙星对细胞膜的损伤效果,且荧光强度随木犀草素浓度的增加而增大,表明木犀草素可通过破坏多重耐药金黄色葡萄球菌细胞膜的完整性,增强细胞膜渗透性,导致膜内物质向外释放增多。



试验组与对照组差异极显著(**, $P < 0.01$), 联合用药组与单药组差异极显著(##, $P < 0.01$)。

There was an extremely significant difference between the experimental group and the control group (**, $P < 0.01$), a significant difference between the combination medication group and the single-drug group (##, $P < 0.01$).

图6 恩诺沙星单独使用及与木犀草素联合使用对多重耐药金黄色葡萄球菌细胞膜渗透性的影响

Fig.6 The effect of enrofloxacin alone and in combination with luteolin on the cell membrane permeability of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*

2.8 木犀草素对多重耐药金黄色葡萄球菌耐药性消除的影响

本试验将 $1/2\times\text{MIC}$ 木犀草素对耐药受试菌刺激培养4代后,测定其对恩诺沙星的敏感度水平。在刺激培养之前,恩诺沙星对受试菌的MIC为 $8\text{ }\mu\text{g/mL}$;木犀草素刺激培养后,恩诺沙星的MIC下降至 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$,降低至原来的50%,表明木犀草素能够有效恢复多重耐药金黄色葡萄球菌对恩诺沙星的敏感性,从而有助于延长恩诺沙星的临床应用寿命。

3 讨论

多重耐药金黄色葡萄球菌作为典型的人畜共患耐药菌,其危害公共卫生、宠物饲养以及动物性食品链等多个重要领域。一方面,多重耐药金黄色葡萄球菌通过直接接触传播,可引发人类菌血症、脓毒血症等严重感染^[17];另一方面,该菌可在宠物间定殖,并通过“动物-人”传播链间接影响人群健康。此外,多重耐药金黄色葡萄球菌污染动物性食品后,不仅影响食品动物的生长性能和肉制品品质,还可能通过食源性途径引发人类感染,对畜牧业经济效益及公众健康构成双重威胁^[18]。近年来,养殖业中抗生素的不规范使用(如盲目预防性用药、剂量不足等)加速了多重耐药金黄色葡萄球菌耐药性的进化,导致其对 β -内酰胺类、氟喹诺酮类等抗生素的耐药率持续升高^[19]。金黄色葡萄球菌也是引发感染的重要病原菌之一,广谱抗生素的广泛应用使得多重耐药金黄色葡萄球菌的防控与治疗已成为细菌感染控制的难点^[20]。本研究结合药敏试验和PCR鉴定结果,所分离的菌株携带*sul-2*、*ermA*、*SCCmec II/III*等多重耐药基因,符合文献报道中“多重耐药金黄色葡萄球菌携带耐药基因簇”的典型特征^[21-22]。本研究聚焦黄酮类化合物与恩诺沙星联合抗多重耐药金黄色葡萄球菌的效果,旨在为临床耐药性治理提供新的解决思路。

本研究筛选的12种黄酮类化合物中,仅木犀草素与恩诺沙星联合显示出相加作用,其他联合均表现为无关作用。这可能是由于木犀草素所含酚羟基结构更易与细菌细胞膜相互作用,为后续筛选高效黄酮类增效剂提供了重要的结构参考。木犀草素作为一种天然黄酮类化合物,在对抗多重耐药细菌、特别是大肠杆菌方面,展现出超越其直接抑菌活性的重要价值。据报道, $1/4\times\text{MIC}$ 的木犀草素可使恩诺沙星抑菌效果提升2~4倍,其增效效果与万古霉素-恩诺沙星联用相当^[19]。木犀草素作为天然植物提取物,具有更高的安全性(无毒浓度下即可增效^[23]),还可有效减少恩诺沙星的使用剂量,从源头上降低耐药性产生风险。木犀草素的抗菌作用主要通过多靶点、多途径协同实现。本研究中,当 $1/2\times\text{MIC}$ 的恩诺沙星(已无法单独有效抑菌)与亚抑菌浓度的木犀草素联用时,产生了显著的相加效应。AKP活性变化结果显示,联合用药组均能诱导AKP泄漏,且呈现显著的木犀草素浓度依赖性。AKP泄漏是细菌外膜乃至内膜结构完整性遭到破坏、通透性增加的重要指标^[24]。木犀草素可通过其疏水结构插入膜脂双分子层,干扰磷脂分子的有序排列,增加膜流动性并诱发非选择性孔隙形成,从而导致包括AKP在内的周质内容物外泄^[25]。更重要的是,膜通透性增大使得恩诺沙星快速进入菌体,进而跨过内膜到达胞内靶点(DNA旋转酶)^[26]。生物被膜是细菌附着于生物或非生物表面后,分泌胞外多糖、蛋白质及核酸等基质包裹自身所形成的复杂三维结构,该结构能有效阻止抗生素进入菌体,是导致临床感染不愈和耐药性加剧的核心因素之一^[27]。本研究的结晶紫染色试验结果显示, $1/2\times\text{MIC}$ 恩诺沙星联合 $1/4\times\text{MIC}$ 的木犀草素与单独使用恩诺沙星相比具有显著差异,表明两者联用能显著抑制受试菌的生物被膜形成,且该效应随木犀草素浓度增加而增强。木犀草素抑制生物被膜形成的机制可能与干扰细菌群体感应系统和抑制细菌代谢有关。黄酮类化合物如木犀草素可作为群体感应抑制剂,竞争性结合信号分子受体,下调与生物被膜形成及毒力因子分泌相关基因(如*icaA*、*fmbA*)的表达,从而从源头上抑制细菌的聚集与基质合成^[28-29]。木犀草素还可能通过干扰核黄素介导能量代谢,导致ATP合成受阻,破坏细菌结构的稳定性,使形成的生物被膜更为稀疏、脆弱^[30]。细胞膜渗透试验结果显示加入 $1/4\times\text{MIC}$ 木犀草素可显著增强恩诺沙星对细胞膜的损伤作用,表明木犀草素能增加细胞膜通透性发挥抗菌作用。细菌细胞膜损伤会导致胞内离子和营养物质的泄漏,这不仅直接损害细菌的物质代谢,也使得依赖质子动力势的外排泵功能受阻。因此,本研究中生长曲线抑制、AKP泄漏及细菌生物被膜形成减少

等结果均表明,木犀草素通过直接破坏细胞膜完整性,导致膜通透性增加,促进细菌内容物泄漏,并加速抗生素内流,最终实现对多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌作用。此外,在无抑菌条件下,仅以亚抑菌浓度($1/2 \times \text{MIC}$)的木犀草素对多重耐药金黄色葡萄球菌进行短期(4代)刺激后,菌株对恩诺沙星的敏感性提高(MIC降低至原来的50%),表明木犀草素不仅能在瞬时联合应用中增敏抗生素,还具备潜在的耐药性消减能力。植物活性成分可通过非突变方式调控细菌耐药相关基因的表达,使细菌在无传统抗生素压力时下调耐药基因,从而恢复对抗生素的敏感性^[31]。本研究发现木犀草素可能具有消减细菌耐药性的能力,不仅可能提高现有抗生素的治疗效果,更有望延缓甚至部分逆转耐药菌株的耐药性,从而延长抗生素的临床使用寿命。这为设计新型的抗菌策略提供了理论依据,如作为“抗生素耐药”期间的辅助治疗,或用于长期慢性感染的管理。

然而,本研究存在一定局限性:首先,所用试验菌株仅为贵州大学兽医药理实验室保存的单一菌株,尚未涵盖临床分离的不同基因型多重耐药金黄色葡萄球菌,后续需扩大菌株代表性以验证结果的普适性;其次,体外试验结果尚需通过动物感染模型进一步验证,以评估联合用药在体内的有效性与安全性,以及需要对耐药基因进一步检测。结合畜牧养殖实践与兽医临床需求,针对多重耐药金黄色葡萄球菌的防控,应加强源头防控、推广“精准联合用药”和强化动物性食品链中多重耐药金黄色葡萄球菌的监测与风险评估,从而降低耐药菌株通过食品途径传播至人类的风险。

4 结 论

12种黄酮类化合物在联合对抗多重耐药金黄色葡萄球菌时,除木犀草素表现出相加作用外,其他黄酮类化合物如牡荆素、异牡荆素、染料木素等均呈现出无关作用。木犀草素通过增加碱性磷酸酶渗出,降低生物被膜形成能力及增强细胞渗透性,破坏细菌细胞壁和细胞膜的完整性,进而与恩诺沙星发挥出联合抑菌作用。因此,木犀草素能恢复受试菌对恩诺沙星的敏感性,这为兽医临床耐药菌感染的治疗提供了新方案,也为天然药物辅助抗生素增效的研究提供了数据支持。

参考文献 References:

- [1] 农业农村部.农业农村部关于印发《全国兽用抗菌药使用减量化行动方案(2021—2025年)》的通知[J].中华人民共和国农业农村部公报,2021(11):55-58.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Notice of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on issuing the national action plan for reducing the use of veterinary antibacterial drugs (2021—2025) [J]. Gazette of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2021(11):55-58.
- [2] 王宏海,于传波,邢进.某医院2020—2024年金黄色葡萄球菌耐药性监测分析[J].医药前沿,2025,15(19):142-146.
WANG H H, YU C B, XING J, et al. Surveillance of drug resistance of *Staphylococcus aureus* in a hospital from 2020 to 2024 [J]. Journal of frontiers of medicine, 2025, 15(19): 142-146.
- [3] 刘金平,吕世明,谭艾娟,等.中药提取物恢复耐药大肠杆菌对氨基糖苷类药物敏感性的研究[J].畜牧与兽医,2018,50(3):107-111.
LIU J P, LYU S M, TAN A J, et al. Restoring the sensitivity of drug-resistant *Escherichia coli* to aminoglycoside antibiotics using Chinese herbal extracts [J]. Animal husbandry & veterinary medicine, 2018, 50(3): 107-111.
- [4] 孙盈盈.白藜芦醇与黄芩苷联用恢复 *mcr-1* 阳性 *Escherichia coli* 对黏菌素的敏感性[D].合肥:安徽农业大学,2024.
SUN Y Y. The combination of resveratrol and baicalin restored the sensitivity of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* to colistin [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2024.
- [5] HUANG Y H, WANG Z Q, LIU Z Y, et al. Gigantol restores the sensitivity of *mcr* carrying multidrug-resistant bacteria to colistin [J]. Phytomedicine. 2023, 117: 154886.
- [6] 康艳华,钟翌芃,马强,等.血根碱联合 β -内酰胺类抗生素对金黄色葡萄球菌的抗菌作用[J].中国兽医杂志,2025,61(3):50-57.
KANG Y H, ZHONG Y P, MA Q, et al. Antibacterial effect of sanguinarine combined with β -lactam antibiotics on *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2025, 61(3): 50-57.

- [7] 肖潇,李英伦,杨锐.复方蒲公英对金黄色葡萄球菌耐药质粒的体外消除试验[J].中国兽医科学,2010,40(3),307-311.
- XIAO X,LI Y L,YANG R.Elimination test *in vitro* of complex prescription dandelion's injection on antibiotic-resistant plasmid of *Staphylococcus aureus*[J].Chinese veterinary science,2010,40(3),307-311.
- [8] 张鹏.以大肠杆菌 AcrB 为靶点的外排泵中药抑制剂的筛选及作用机制研究[D].保定:河北农业大学,2021.
- ZHANG P.Research on screening and mechanism of Chinese herbal medicine inhibitors targeting *Escherichia coli* AcrB[D].Baoding:Hebei Agricultural University,2021.
- [9] WENG Z B,ZENG F,WANG M X,et al.Antimicrobial activities of lavandulylated flavonoids in *Sophora flavences* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via membrane disruption[J].Journal of advanced research,2023,57,197-212.
- [10] 白光耀,谭艾娟,吕世明,等.生鲜乳金黄色葡萄球菌污染来源调查及其耐药性[J].天津农业科学,2014,20(5):101-103.
- BAI G Y,TAN A J,LYU S M,et al.Investigation of pollution sources and resistance assay of *Staphylococcus aureus* in raw fresh milk[J].Tianjin agricultural sciences,2014,20(5):101-103.
- [11] XU X J,XU L,YUAN G J,et al.Synergistic combination of two antimicrobial agents closing each other's mutant selection windows to prevent antimicrobial resistance[J].Scientific reports,2018,8(1):7237.
- [12] 吴雪娇,徐莉,李沛波,等.阿扎霉素F衍生物及联合维生素K₃抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌研究[J].中国抗生素杂志,2016,41(8):6.
- WU X J,XU L,LI P B,et al.The anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activities of azalomycin F derivatives and those of them combined with vitamin K₃[J].Chinese journal of antibiotics,2016,41(8):6.
- [13] 马彦军.光甘草定联合β-内酰胺类抗生素减弱MRSA致病性和耐药性的机制研究[D].银川:宁夏大学,2025.
- MA Y J.Mechanism of attenuation of pathogenicity and resistance of MRSA by glabridin combined with beta-lactam antibiotics[D].Yinchuan:Ningxia University,2025.
- [14] 张伟.荧光定量PCR技术检测SA耐药/毒力基因的应用价值分析[J].实验室检测,2025,3(19):226-228.
- ZHANG W.Analysis of the application value of fluorescent quantitative PCR technology in detecting SA resistance/virulence genes[J].Laboratory testing,2025,3(19):226-228.
- [15] 王龙海,王业梅,吴惠,等.苦参碱对耳念珠菌生物膜的抑制作用[J].微生物学报:2025,65(10),4700-4713.
- WANG L H,WANG Y M,WU H,et al.Inhibition mechanism of matrine against biofilm formation of *Candida auris*[J].Acta microbiologica Sinica,2025,65(10),4700-4713.
- [16] 马毛毛.单癸酸甘油酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性及作用机制[D].南昌:南昌大学,2022.
- MA M M.Antibacterial activity and mechanism of monocaprin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[D].Nanchang:Nanchang University,2022.
- [17] 田以萱,叶千红.联合用药治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的研究进展[J].中华医院感染学杂志,2025,35(13):2068-2073.
- TIAN Y X,YE Q H.Progress of research on combined drug therapies for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J].Chinese journal of nosocomiology,2025,35(13):2068-2073.
- [18] 冯倩倩,陈森,何嘉丽,等.夫西地酸联合黄芩素对金黄色葡萄球菌的体内外抗菌作用研究[J].中国抗生素杂志,2024,49(1):90-99.
- FENG Q Q,CHEN M,HE J L,et al.Antibacterial effect of fusidic acid combined with baicalein on *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*[J].Chinese journal of antibiotics,2024,49(1):90-99.
- [19] 徐修礼,魏娟,孙怡群,等.抗菌药物联用对耐甲氧西林葡萄球菌的体外抗菌活性研究[J].西南国防医药,2008,(1),36-37.
- XU X L,WEI J,SUN Y Q,et al.Study of combined antibacterial activity of routine antimicrobial agents against methicillin resistance *Staphylococcus*[J].Medical journal of national defending forces in southwest China,2008,(1),36-37.
- [20] 郭园.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的危险因素与耐药性分析[J].临床医学研究与实践,2025,10(20):37-41.
- GUO Y.Analysis of risk factors and drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J].Clinical research and practice,2025,10(20):37-41.
- [21] MLYNARCZYK-BONIKOWSKA B,KOWALEWSKI C,KROLAK-ULINSKA A,et al.Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*[J].International journal of molecular sciences,2022,23(15),8088.

- [22] 刘明. 大黄素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体内、外抗菌作用及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
LIU M. Investigation on its anti-MRSA effects of emodin *in vitro* and *in vivo*, and its mechanisms[D]. Chongqing: Army Medical University, 2015.
- [23] LUO Z Q, XU Y D, QIU L X, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction based on response surface methodology using HPLC-DAD for the analysis of red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones and its anti-inflammatory activities on LPS-induced 3D4/2 cell[J]. *Frontiers in veterinary science*, 2023, 10: 1279178.
- [24] YU J Y, HONG C L, YIN L F, et al. Antimicrobial activity of phenyllactic acid against *Klebsiella pneumoniae* and its effect on cell wall membrane and genomic DNA[J]. *Brazilian journal of microbiology*, 2023, 54(4): 3245-3255.
- [25] MAHAMUD A U, ASHRAFUDOUILLA M, NAHAR S, et al. Luteolin exhibits antimicrobial actions against *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli*: impairment of cell adhesion, membrane integrity, and energy metabolism[J]. *Food control*, 2024, 166: 110734-110734.
- [26] 吕世明, 王志明. 兽医药理学[M]. 重庆: 西南大学出版社, 2024.
LYU S M, WANG Z M. Veterinary pharmacology[M]. Chongqing: Southwest University Press, 2024.
- [27] YU L M, SHANG F, CHEN X L, et al. The anti-biofilm effect of silver-nanoparticle-decorated quercetin nanoparticles on a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5711.
- [28] CHEN Y, LIU T J, WANG K, et al. Baicalein inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the quorum sensing system *in vitro*[J]. *PLoS one*, 2016, 11(4): e0153468.
- [29] 曹瑶. 花生壳中木犀草素对金黄色葡萄球菌的抗菌活性及其机理研究[D]. 南京: 南京财经大学, 2021.
CAO Y. Study on antibacterial activity and mechanism of luteolin from peanut shell against *Staphylococcus aureus*[D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and Economics, 2021.
- [30] 丁亚豪. 淡竹叶抗菌活性成分分离及抗多重耐药大肠杆菌作用机制研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2024.
DING Y H. Isolation of antibacterial active components from bamboo leaves and study on their mechanism of action against multi-drug resistant *Escherichia coli*[D]. Guiyang: Guizhou University, 2024.
- [31] 王金丽. 黄芩苷逆转鸢尾源多重耐药腐生葡萄球菌对阿奇霉素耐药性的作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
WANG J L. Mechanism of baicalin reverses the resistance of multidrug-resistant *Staphylococcus saprophyticus* from francolins to azithromycin[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022.

(责任编辑: 刘俊峰)