抗寄生虫药物雷琐太尔对表皮葡萄球菌的抗菌活性及其抗菌机制

郭绍伟[1,2]，黄冠清[2,3]，肖丹[1,2]，陆丽华[1,2]，李梦娜[2,3]，李懿敏[2]，伍勇[2]

[1. 南华大学衡阳医学院长沙市第一医院研究生协作培养基地，衡阳 421001；2. 长沙市第一医院(中南大学湘雅医学院附属长沙医院)检验科，长沙 410005；3. 中南大学湘雅医院检验科，长沙 410008]

[摘 要] 目的：表皮葡萄球菌是临床常见的机会致病菌，抗生素滥用致其耐药性不断攀升，治疗难度显著加大。药物再利用具有成本低、安全性高、周期短等优势，是应对耐药菌感染的有效策略。本研究旨在探究抗寄生虫药物雷琐太尔对表皮葡萄球菌的抗菌活性，并初步阐明其作用机制。**方法：**采用微量肉汤稀释法测定雷琐太尔对表皮葡萄球菌的最低抑制浓度(minimal inhibitory concentration，MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration，MBC)。采用纸片扩散法、2, 3-二(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四氮唑-5-甲酰苯胺[2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid，XTT]法及时间-杀菌曲线检测雷琐太尔对表皮葡萄球菌的敏感性。通过连续诱导耐药试验评估其耐药诱导能力。利用结晶紫染色和XTT法检测该药对生物膜的抑制与根除作用。采用棋盘微稀释法探究其与传统抗生素的联合效果。通过测定膜通透性、质子动力势、细菌内腺苷三磷酸(adenosine triphosphate，ATP)水平及碘化丙啶染色初步阐明抗菌机制。最后建立小鼠皮肤脓肿模型，评价雷琐太尔的体内抗菌活性。**结果：**雷琐太尔对表皮葡萄球菌的MIC和MBC分别为2 μg/mL和16 μg/mL。纸片扩散法显示雷琐太尔对表皮葡萄球菌具有明显的抑菌作用。XTT法结果显示，雷琐太尔可显著降低表皮葡萄球菌的活力(P<0.05)。时间-杀菌曲线显示1/4×MIC雷琐太尔即可有效抑制细菌的增殖。连续处理15 d，表皮葡萄球菌均未对雷琐太尔产生耐药。结晶紫染色和XTT染色均显示，1 μg/mL的雷琐太尔可显著抑制生物膜的形成，2 μg/mL的雷琐太尔可使已形成的生物膜显著减少(均P<0.05)。雷琐太尔可改变质子动力势、抑制细菌内ATP合成并破坏细菌细胞膜完整性。在小鼠皮肤脓肿模型中，经雷琐太尔治疗后，脓肿组织的细菌载量显著降低(P<0.05)。**结论：**雷琐太尔对表皮葡萄球菌具有体外和体内抗菌作用，其抗菌机制在于破坏表皮葡萄球菌的完整性，改变质子动力势，以及抑制细胞内ATP的合成。

[关键词] 表皮葡萄球菌；雷琐太尔；生物膜；质子动力势；最低抑制浓度；最低杀菌浓度

Antibacterial activity and mechanism of the antiparasitic drug resorantel against *Staphylococcus epidermidis*

GUO Shaowei[1,2], HUANG Guanqing[2,3], XIAO Dan[1,2], LU Lihua[1,2], LI Mengna[2,3], LI Yimin[2], WU Yong[2]

[1. Postgraduate Collaborative Training Base, Changsha First Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001; 2. Department of Clinical Laboratory, Changsha First Hospital (Changsha Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine, Central South University), Changsha 410005; 3. Department of Clinical Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China]

ABSTRACT **Objective:** *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) is a common opportunistic

收稿日期(Date of reception)：2025-09-28

第一作者(First author)：郭绍伟，Email: guoshaowei2024@163.com, ORCID: 0009-0005-1423-622X

通信作者(Corresponding author)：伍勇，教授，Email: wuyong_xy@163.com, ORCID: 0000-0002-3667-8716

基金项目(Foundation item)：湖南省重点领域研发计划(2022SK2116)。This work was supported by the Key Research and Development Program of Hunan Province, China (2022SK2116).

开放获取(Open access)：本文遵循知识共享许可协议，允许第三方用户按照署名-非商业性使用-禁止演绎4.0(CC BY-NC-ND 4.0)的方式，在任何媒介以任何形式复制、传播本作品(https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)。

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

pathogen in clinical settings. The widespread misuse of antibiotics has led to a continuous increase in its antimicrobial resistance, greatly complicating treatment. Drug repurposing, characterized by low cost, high safety, and short development cycles, represents an effective strategy for combating drug-resistant bacterial infections. This study aims to investigate the antibacterial activity of the antiparasitic drug resorantel against *S. epidermidis* and to preliminarily elucidate its antibacterial mechanism.

Methods: The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of resorantel against *S. epidermidis* were determined using the broth microdilution method. Disk diffusion assays, 2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assays, and time-kill curves were employed to evaluate the susceptibility of *S. epidermidis* to resorantel. Serial induction experiments were conducted to assess the potential for resistance development. Crystal violet staining and XTT assays were used to evaluate the inhibitory and eradication effects of resorantel on biofilms. The checkerboard microdilution method was performed to investigate the combined effects of resorantel with conventional antibiotics. Antibacterial mechanisms were preliminarily explored by assessing membrane permeability, proton motive force, intracellular adenosine triphosphate (ATP) levels, and propidium iodide staining. Finally, a murine skin abscess model was established to evaluate the in vivo antibacterial activity of resorantel.

Results: The MIC and MBC of resorantel against *S. epidermidis* were 2 μg/mL and 16 μg/mL, respectively. Disk diffusion assays demonstrated a pronounced antibacterial effect of resorantel against *S. epidermidis*. XTT assay results demonstrated that resorantel significantly reduced the viability of *S. epidermidis* (P<0.05). Time-kill curve analysis indicated that even 1/4×MIC of resorantel effectively inhibited bacterial proliferation. After continuous exposure for 15 d, *S. epidermidis* did not develop resistance to resorantel. Crystal violet staining and XTT staining both revealed that 1 μg/mL resorantel significantly inhibited biofilm formation, while 2 μg/mL resorantel significantly reduced preformed biofilms (all P<0.05). Resorantel altered the proton motive force, inhibited intracellular ATP synthesis, and disrupted bacterial cell membrane integrity. In the murine skin abscess model, resorantel treatment significantly reduced the bacterial burden within abscess tissues (all P<0.05).

Conclusion: Resorantel exhibits both in vitro and in vivo antibacterial activity against *S. epidermidis*. Its antibacterial mechanism involves disruption of bacterial membrane integrity and proton motive force, as well as inhibition of intracellular ATP synthesis.

KEY WORDS　*Staphylococcus epidermidis*; resorantel; biofilm; proton motive force; minimal inhibitory concentration; minimal bactericidal concentration

表皮葡萄球菌是1种常见的革兰氏阳性球菌[1]，通常以共生方式定植于皮肤、鼻腔及黏膜等上皮表面[2]，是健康人体皮肤中最为丰富的细菌之一[3]。然而，该菌能够强烈黏附于医疗器械表面，成为植入物相关感染的重要病原体。表皮葡萄球菌日益被认为是多种严重感染的致病因素，包括菌血症、败血症、心内膜炎、脑膜炎、中毒性休克综合征，以及浅表皮肤感染、眼部感染[4-6]和与分流器、导管、假体关节等植入器械相关的感染。作为一种机会性病原体，它持续对脆弱患者构成重大健康风险。

表皮葡萄球菌易形成对抗生素高度耐药的生物膜[7]。感染的早期依赖于细菌对表面的黏附，该初始步骤是细菌逃避宿主清除、建立立足点的关键环节；成功黏附后，生物膜开始形成。过去二十年间，耐甲氧西林表皮葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*，MRSE)的发病率急剧上升，在医院隔离患者中更为常见，例如在发生血流感染的新生儿群体中[8-9]。因此，亟需扩充抗菌药物

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

库，寻找对MRSE具有活性的药物。药物再利用等策略为此提供了可行途径。

以质子动力势为靶点的抗菌药物可有效破坏细菌的能量代谢等关键生理过程，为抗菌治疗(尤其是在生物膜和耐药菌株日益高发的背景下)提供了新思路[10]。通过筛选，研究者[11]发现抗寄生虫药物雷琐太尔具有抗菌活性。雷琐太尔原用于控制反刍动物副胃虫和扩展莫尼茨绦虫[12]，也用于治疗牛羊吸虫病及控制埃及伊蚊[13]。质子动力势是细菌细胞膜两侧的电化学梯度，驱动生物膜形成、腺苷三磷酸(adenosine triphosphate，ATP)合成、营养摄取及废物排泄等众多基本生理过程[14]。干扰质子动力势的抗菌药物通过损害质子泵功能影响细菌生理，破坏细菌内外的电化学梯度，进而影响其能量代谢与营养吸收[14]。由于质子泵功能受损，细菌无法维持必需的质子动力势，导致生长受阻甚至死亡[14]。靶向质子动力势在抗菌及抗生物膜药物开发中具有重要的潜力和价值。本研究以细菌质子动力势为关键生理靶点，揭示雷琐太尔的抗菌机制，旨在为耐药菌及生物膜感染的治疗提供新的候选药物与策略。

1 材料与方法

1.1 伦理声明

本研究已获得中南大学湘雅三医院伦理委员会批准(审批号：CSU-2024-0280)。

1.2 材料

1.2.1 主要试剂与仪器

胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth，TSB)购自中国上海索莱宝科技有限公司；二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide，DMSO)、结晶紫染液、2, 3-二(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四氮唑-5-甲酰苯胺[2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid，XTT]染液、雷琐太尔、庆大霉素(gentamicin，GEN)、妥布霉素(tobramycin，TOB)、阿米卡星(amikacin，AMK)、环丙沙星(ciprofloxacin，CIP)、万古霉素、达托霉素和蜂毒肽均购自美国MedChem Express公司；SYTO 9绿色荧光核酸染料(SYTO 9 green fluorescent nucleic acid stain，SYTO 9)和SYTO X Green均为美国Thermo Fisher Scientific公司产品；ATP检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。雷琐太尔、万古霉素、达托霉素、CIP和蜂毒肽等抗菌药溶于去离子水或DMSO。

酶标仪购自美国Bio-tek公司和PerkinElmer EnVision公司。96孔细胞培养板和50 mL离心管均购自美国康宁公司。激光共聚焦显微镜购自德国蔡司公司。

1.2.2 菌株

表皮葡萄球菌标准菌株RP62A和ATCC 12228均购自美国菌种保藏中心，其他11株表皮葡萄球菌临床分离株来源于2022至2024年在中南大学湘雅三医院就诊患者的血液标本，经羊血平板分纯和质谱鉴定。所有菌种均接种于甘油磁珠中，于−80 ℃保存，且在哥伦比亚血琼脂培养基上传代2次后用于后续研究。表皮葡萄球菌在TSB中培养。

1.2.3 动物

7周龄雌性美国癌症研究所(Institute of Cancer Research，ICR)小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，体重23~27 g。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验

1.3.1.1 微量肉汤稀释试验

将表皮葡萄球菌培养至对数中期，然后用Mueller-Hinton(MH)肉汤将细菌悬液调整至0.5麦氏浊度，并按照1∶200比例稀释。将雷琐太尔用MH肉汤进行倍比稀释，取不同浓度的50 μL雷琐太尔于96孔板中，与50 μL细菌悬液混合，孵育16~18 h后读取最低抑制浓度(minimal inhibitory concentration，MIC)。MIC为在37 ℃下孵育16~18 h后肉眼可见抑制细菌增殖的最低抗菌药物浓度。取96孔板液体点样，孵育24 h后未见菌落生长，对应浓度为最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration，MBC)。

1.3.1.2 纸片扩散法

将培养至对数中期的表皮葡萄球菌调整到0.5麦氏浊度，取100 μL细菌悬液至MH琼脂平板上，然后用无菌棉签将细菌悬液均匀涂布。将空白纸片均匀放置于琼脂表面，分别将等量雷琐太尔、达托霉素和万古霉素滴加至空白纸片中央。37 ℃孵育16~18 h后，测量抗菌剂所在区域周围完全抑制细菌生长的抑菌圈直径。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照。

1.3.1.3 棋盘试验

抗生素联用可降低药物的MIC。用棋盘稀释法测定雷琐太尔与传统抗生素联用的分级抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index，FICI)。在含有对数期表皮葡萄球菌(1×10^6 CFU/mL)的96孔板中，将2倍稀释的雷琐太尔与等体积的常规抗生素混合，于37 ℃孵育16~18 h后测定630 nm处的吸光度值。$FICI=(MIC_{A,\ 联合}/MIC_{A,\ 单独})+(MIC_{B,\ 联合}/MIC_{B,\ 单独})$。$MIC_{A,\ 单独}$表示药物A单独使用时的MIC，$MIC_{A,\ 联合}$表示药物A与药物B联合使用时，达到联合抑菌效果所需药物A的MIC，$MIC_{B,\ 单独}$表示药物B单独使用时的MIC，$MIC_{B,\ 联合}$表示药物A与药物B联合使用时，达到联合抑菌效果所需药物B的MIC。$FICI\leqslant0.5$表示协同作用；$0.5<FICI\leqslant4$表示无交互作用；$FICI>4$表

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

示拮抗作用[15]。

1.3.2 时间-杀菌曲线

将对数生长期的细菌悬液浊度调节至0.5麦氏浊度，再用新鲜MH肉汤稀释100倍，将1/4×MIC~4×MIC的雷琐太尔加入5 mL细菌悬液中，分别于0、2、4、8、12和24 h取样计数，采用平板计数法测定活菌数。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照。

1.3.3 生物膜抑制试验和生物膜根除试验

生物膜抑制试验通常用于评估药物抑制生物膜形成的能力。生物膜根除试验用于评估药物是否有能力破坏成熟的生物膜。生物膜抑制试验：将过夜培养的表皮葡萄球菌1∶100稀释后，加入含有雷琐太尔(2倍稀释)的96孔板中。在37 ℃下孵育24 h后，用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline，PBS)洗涤2次，去除未附着的细菌。采用2种方法进行检测。1)用0.25%的结晶紫溶液染色15 min后洗涤3次，再用95%乙醇处理20 min，测量570 nm处的吸光度值。2)加入100 μL XTT(0.2 mg/mL)和PMS(0.2 mg/mL)混合液，避光孵育3 h后，测量490 nm处的吸光度值。生物膜根除试验：取上述细菌悬液200 μL加入96孔板孵育24 h，构建成熟的生物膜。洗涤去除浮游细菌，加入倍比稀释的药物200 μL，再孵育24 h。洗涤3次，采用结晶紫和XTT染色法(同上)测定剩余生物膜相对量。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照。

1.3.4 激光共聚焦显微镜观察生物膜

将稀释的表皮葡萄球菌悬液共3 mL接种至装有预先消毒载玻片的6孔板中，37 ℃孵育24 h后，洗涤去除浮游细菌，用10 μmol/L SYTO 9与10 μmol/L碘化丙啶(propidium iodide，PI)混合液避光染色15 min。使用激光共聚焦显微镜观察生物膜的形态结构。其中，PI的激发/发射波长为535 nm/617 nm，SYTO 9的激发/发射波长为485 nm/498 nm。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照。

1.3.5 连续耐药诱导试验

使用抗生素后，细菌可能产生耐药性，从而降低抗菌疗效。雷琐太尔对表皮葡萄球菌RP62A的MIC测定方法如上所述。随后将1/2×MIC孔板中的1 μL细菌悬液用新鲜MH肉汤稀释(稀释比1∶1 000)，用于次日的MIC检测。经过24 h的潜伏期后，记录MIC，并在连续15 d内每天重复此过程。同时，CIP作为对照。与第1天测得的初始MIC值比较，计算MIC值的变化。

1.3.6 XTT法测定细菌活力

将表皮葡萄球菌重悬至终浓度为1×10^6 CFU/mL，并暴露于1/8×MIC~2×MIC的抗菌药物。孵育16~18 h后，离心样品，向每个样品中加入1 mL XTT溶液。避光孵育3 h后，测定490 nm波长处的吸光度值。以DMSO(0.5%，vol/vol)作为阴性对照。

1.3.7 SYTO X Green荧光探针测定膜通透性

SYTO X Green是一种对细胞膜完整性敏感的荧光探针，可用于检测膜损伤。表皮葡萄球菌RP62A在TSB中培养至对数生长期，用PBS洗涤，并重悬于5 mmol/L HEPES缓冲液(pH值=7.2)中。向悬浮液中加入SYTO X Green至终浓度5 mmol/L。避光孵育30 min后，将10 μL指示浓度的雷琐太尔与90 μL细菌悬液加入黑色96孔板中。用酶标仪检测荧光强度(激发波长/发射波长485 nm/525 nm)，单位为任意单位(arbitrary units，AU)。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照，蜂毒肽作为阳性对照。

1.3.8 $DiSC_3(5)$荧光探针检测膜电位

质子动力势主要由膜电位和膜上质子浓度差组成。洗涤对数期的表皮葡萄球菌RP62A，并将其在630 nm处的吸光度值调整至0.05。将细菌重悬于含有5 mmol/L葡萄糖和100 mmol/L KCl的HEPES缓冲液(pH=7.2)中，用2 μmol/L $DiSC_3(5)$避光孵育细菌悬液30 min。将90 μL含10 μL雷琐太尔的细菌悬液加入黑色96孔板中。用酶标仪检测荧光强度(激发波长/发射波长622 nm/670 nm)，单位为AU。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照，蜂毒肽作为阳性对照。

1.3.9 BCECF-AM荧光探针检测细菌内pH值

BCECF-AM是一种pH敏感型荧光探针，在细菌内被水解为带电荷的BCECF。BCECF的荧光强度随环境pH值的变化而改变，在特定激发/发射波长下，荧光强度与pH呈正相关。质子动力势中的膜上质子浓度差直接决定了细菌内的pH值。为进一步验证，利用BCECF-AM荧光探针测定表皮葡萄球菌内pH值的变化，以评估雷琐太尔是否通过影响质子动力势发挥抗菌作用。收集对数期的表皮葡萄球菌RP62A，洗涤后重悬于HEPES缓冲液中，将630 nm处吸光度值调整至0.2。将指示浓度的雷琐太尔和20 μmol/L的pH敏感染料BCECF-AM同时加入黑色96孔板中，37 ℃避光孵育30 min后，用酶标仪检测荧光强度(激发波长/发射波长488 nm/535 nm)，单位为AU。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照。

1.3.10 ATP定量试验

使用增强的ATP检测试剂盒定量检测细菌内ATP浓度。将对数期的表皮葡萄球菌RP62A洗涤并重悬于PBS中，将630 nm处吸光度值调整至0.5。加入指示浓度的雷琐太尔，37 ℃孵育1 h。在4 ℃离心(10 000 r/min)5 min后，加入100 μL溶菌酶，煮沸2 min，再次离心上清液，与工作试剂混合。避光孵育5 min后，用酶标仪测定样品的化学发光强度，单位为相对发光单位(relative light units，RLU)。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照，蜂毒肽作为阳性对照。

1.3.11 PI染色

PI是一种结合DNA的荧光染料，可以很容易地

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

穿透受损的细胞膜。在PBS(pH=7.4)中洗涤、重悬表皮葡萄球菌RP62A，将630 nm处吸光度值调整至0.5，用10 μmol/L PI孵育30 min，加入雷琐太尔，用酶标仪检测荧光强度(激发波长/发射波长535 nm/615 nm)，单位为AU。以DMSO(0.1%，vol/vol)作为阴性对照，蜂毒肽作为阳性对照。

1.3.12 皮肤脓肿模型

为评估雷琐太尔在体内的抗菌活性，本研究建立了小鼠皮肤脓肿模型。用剃刀和脱毛膏将小鼠背部的毛发刮除。将培养过夜的细菌用生理盐水冲洗，并将含1×10^7 CFU/mL的50 μL细菌悬液皮下注射于小鼠背部。将小鼠随机分为2组，每组6只，分别经皮下注射100 μL DMSO(0.1%，vol/vol)或30 mg/kg雷琐太尔。治疗24 h后，用卡尺测量脓肿的长径(L)和短径(W)，用公式面积=π×(L/2)×(W/2)估算脓肿面积。切取感染组织，匀浆后进行菌落形成单位(colony-forming unit，CFU)计数。

1.4 统计学处理

使用GraphPad Prism 9.0版本统计学软件进行数据的统计与分析。所有试验均独立重复3次，符合正态分布的计量数据以均数±标准差表示。2组间比较采用Student's t检验，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 雷琐太尔抑制表皮葡萄球菌RP62A的生长

雷琐太尔对表皮葡萄球菌标准菌株的MIC为2 μg/mL，MBC为8~16 μg/mL，对11株表皮葡萄球菌临床分离株的MIC为2~4 μg/mL，MBC为8~32 μg/mL(表1)。

表1 雷琐太尔对表皮葡萄球菌的药敏结果

Table 1 Drug sensitivity profile of resorantel against *Staphylococcus epidermidis*

Strains	Characteristics	MIC/(μg·mL^{-1})	MBC/(μg·mL^{-1})
RP62A	Type strain, MSSE, BF	2	16
ATCC 12228	Type strain, MSSE, NBF	2	8
S1	Clinical isolate, MSSE	2	16
S2	Clinical isolate, MSSE	2	16
S3	Clinical isolate, MSSE	2	8
S4	Clinical isolate, MSSE	2	8
S5	Clinical isolate, MSSE	2	8
S6	Clinical isolate, MSSE	2	8
S7	Clinical isolate, MSSE	2	8
S8	Clinical isolate, MSSE	4	16
S9	Clinical isolate, MSSE	2	8
S10	Clinical isolate, MSSE	2	8
S11	Clinical isolate, MSSE	2	32

MIC: Minimum inhibitory concentration; MBC: Minimum bactericidal concentration; MSSE: Methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermidis*; BF: Biofilm; NBF: Non-biofilm.

采用纸片扩散法检测雷琐太尔对表皮葡萄球菌RP62A的抗菌活性，结果(图1A)显示：雷琐太尔的抑菌圈边界模糊，直径为25~26 mm，大于万古霉素(P<0.05)和达托霉素(P<0.05)。

采用XTT法检测细菌活力，结果(图1B)显示，1/8×MIC~2×MIC的雷琐太尔可以显著降低表皮葡萄球菌RP62A的活力(均P<0.05)。

时间-杀菌曲线结果(图1C)表明，雷琐太尔对表皮葡萄球菌RP62A具有浓度依赖性的抗菌作用。在1/4×MIC~2×MIC时，抑菌时间可大于24 h。

在连续诱导耐药试验中，以CIP作为对照，连续诱导15 d后，表皮葡萄球菌RP62A均未对雷琐太尔产生耐药；然而CIP处理的菌株快速获得了耐药性，第15天时MIC为原来的32倍(图1D)。此外，雷琐太尔仍保持对CIP诱导耐药的菌株的敏感性，MIC为2 μg/mL(图1E)，并未产生交叉耐药。

2.2 雷琐太尔的抗生物膜作用

在生物膜抑制试验中，结晶紫染色和XTT染色均显示1 μg/mL的雷琐太尔可显著抑制生物膜的形成(均P<0.05，图2A)；激光共聚焦显微镜观察及定量分析(图2C、2D)进一步证实，与对照组相比，雷琐太尔处理组生物膜内的活菌(绿色)比例显著降低，死菌(红色)比例相应升高，表明雷琐太尔能有效抑制生物膜的形成。在生物膜根除试验中，结晶紫染色和XTT染色均显示2 μg/mL的雷琐太尔可使已形成的生物膜显著减少(均P<0.05，图2B)；激光共聚焦显微镜下可见雷琐太尔处理组死亡细菌(红色)占主导(图

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

2C、2E)，表明雷琐太尔对成熟生物膜具有清除作用。针对临床分离株S3和S8的进一步XTT染色结果显示，0.5 μg/mL的雷琐太尔可显著抑制生物膜形成，2 μg/mL的雷琐太尔可使已形成的生物膜显著减少(均P<0.05，图2F、2G)。

2.3 雷琐太尔与传统抗生素联用的抗菌效果

雷琐太尔与氨基糖苷类抗生素(TOB、GEN和AMK)联用时，FICI均为4.25(>4)，雷琐太尔与氨基糖苷类抗生素联用对表皮葡萄球菌RP62A菌株的抑制呈现拮抗作用(图3)。

2.4 雷琐太尔的抗菌机制

先采用SYTO X Green荧光探针测定膜通透性，结果显示，与阴性对照组相比，1/4×MIC~2×MIC雷琐太尔处理组的荧光强度均无明显变化，提示雷琐太尔并未改变细菌细胞膜的通透性(图4A)。然后，使用$DiSC_3(5)$荧光探针检测雷琐太尔对表皮葡萄球菌细胞膜的质子动力势的破坏作用，1/4×MIC~2×MIC的雷琐太尔处理后，$DiSC_3(5)$的荧光强度较阴性对照组升高，表明雷琐太尔使细胞膜发生了去极化，膜电位降低(图4B)。进一步使用BCECF-AM荧光探针检测细菌内pH值，结果显示，在使用1/4×MIC~2×MIC的雷琐太尔处理后，荧光强度较阴性对照组下降，提示细菌内pH值下降，雷琐太尔通过破坏表皮葡萄球菌的质子动力势发挥作用(P<0.05，图4C)。雷琐太尔处理后细胞内ATP水平较阴性对照组降低(P<0.05，图4D)。PI染色结果显示，雷琐太尔处理后，死亡细菌数量较阴性对照组增加(P<0.05，图4E)。

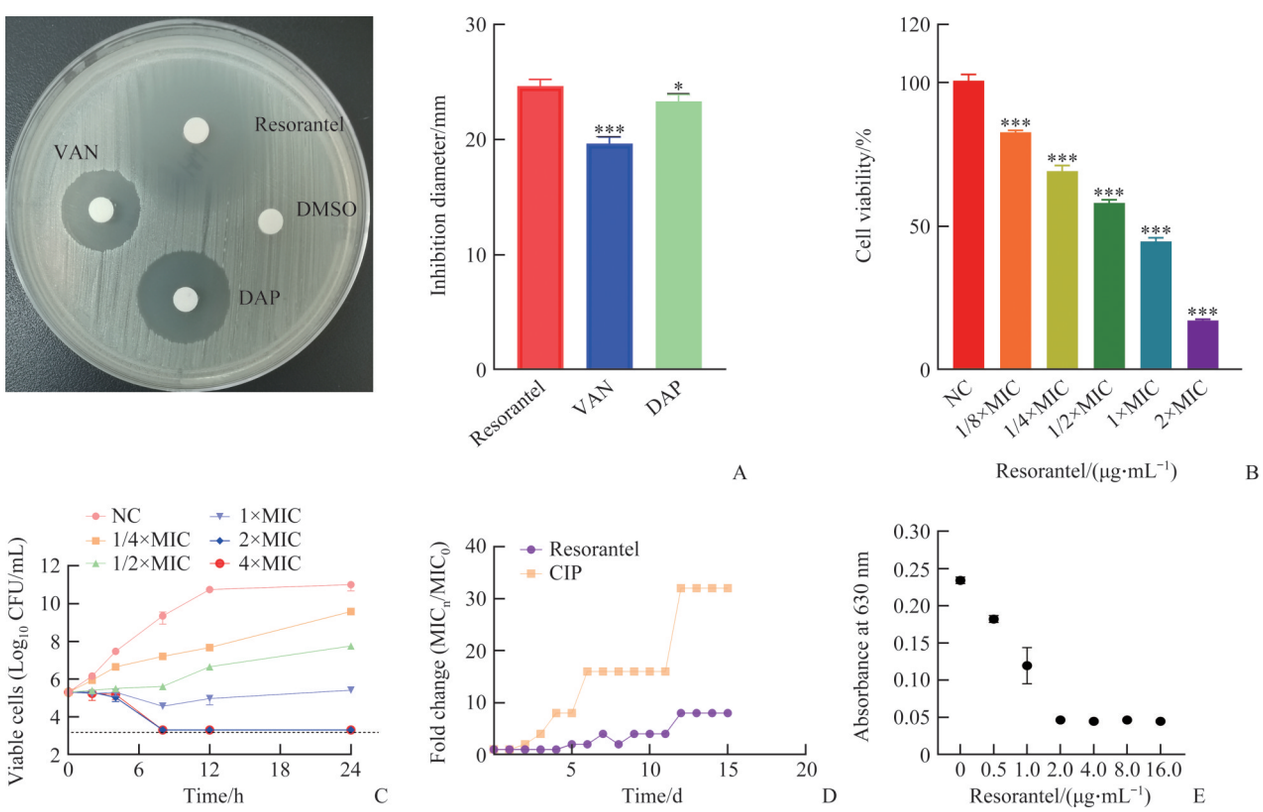


图1　雷琐太尔对表皮葡萄球菌的抑菌活性

Figure 1　Antibacterial activity of resorantel against *Staphylococcus epidermidis*

A: Antibacterial activity of resorantel against *Staphylococcus epidermidis* by the paper diffusion method, showing the diameters of inhibition zones. B: Bacterial viability determined by the XTT method after treatment with resorantel. C: Concentration-dependent antibacterial effect of resorantel against *Staphylococcus epidermidis* at concentrations ranging from 1/4×MIC to 4×MIC. D: Resistance induction assay. Resorantel was applied consecutively for 15 d to assess its ability to induce drug resistance. E: Determination of the MIC of resorantel against bacterial strains that became resistant after 15 d of induction with ciprofloxacin. Results are expressed as mean±standard deviation. Comparisons between 2 groups are performed using Student's t-test. Compared with the resorantel or NC, *P<0.05, ***P<0.001. NC: Negative control, treated with DMSO (0.5%, vol/vol) in the XTT method or with DMSO (0.1%, vol/vol) in other assays. XTT: 2, 3-Bis- (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -2H-tetrazolium-5-carboxanilide; MIC: Minimal inhibitory concentration; CFU: Colony-forming unit; VAN: Vancomycin; DAP: Daptomycin; CIP: Ciprofloxacin. DMSO: Dimethyl sulfoxide.

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

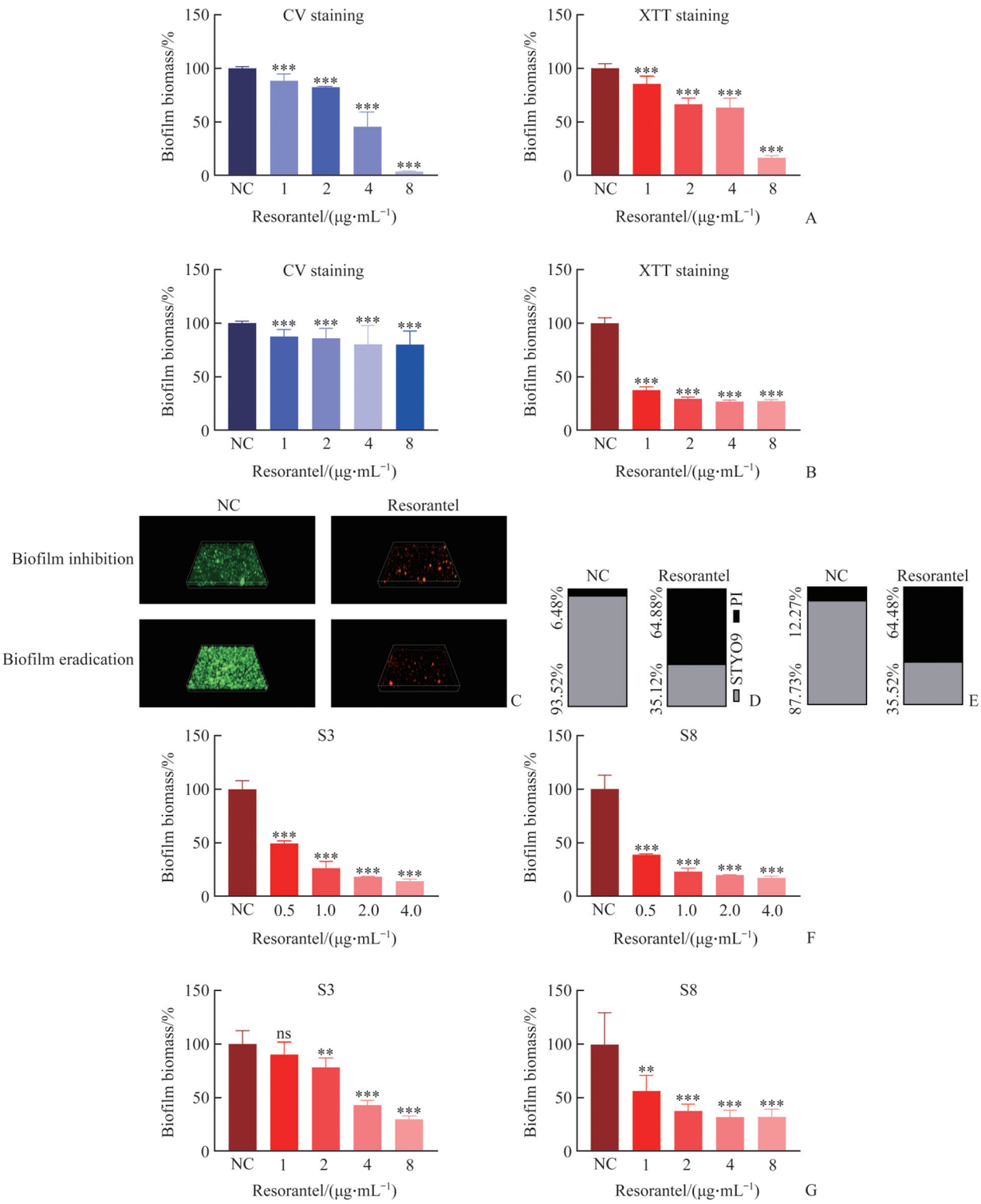


图2 雷琐太尔对表皮葡萄球菌的抗生物膜作用

Figure 2 Anti-biofilm effect of resorantel on *Staphylococcus epidermidis*

A: Biofilm inhibitory effect of resorantel on RP62A. B: Biofilm eradication effect of resorantel on RP62A. C: Laser confocal microscopy images showing the biofilm inhibition and eradication effects of resorantel on RP62A. D and E: Laser confocal microscopy quantitative analysis of the percentage of live and dead bacteria within biofilms in the biofilm inhibition assay (D) and biofilm eradication assay (E), respectively. F and G: XTT staining assay for biofilm inhibition (F) and biofilm eradication (G) of resorantel against clinical strains S3 and S8. Results are expressed as mean±standard deviation. Comparisons between 2 groups are performed using Student's *t*-test. ns: No statistical significance. Compared with the NC, ***P*<0.01, ****P*<0.001. NC: Negative control, treated with DMSO (0.1%, vol/vol).

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

2.5 雷琐太尔的体内抗菌效果

在小鼠皮肤脓肿模型中，与阴性对照组相比，经雷琐太尔治疗后，脓肿面积缩小(图5A)，脓肿组织内的菌落明显减少(图5B)，细菌载量显著降低(P<0.05，图5C)。

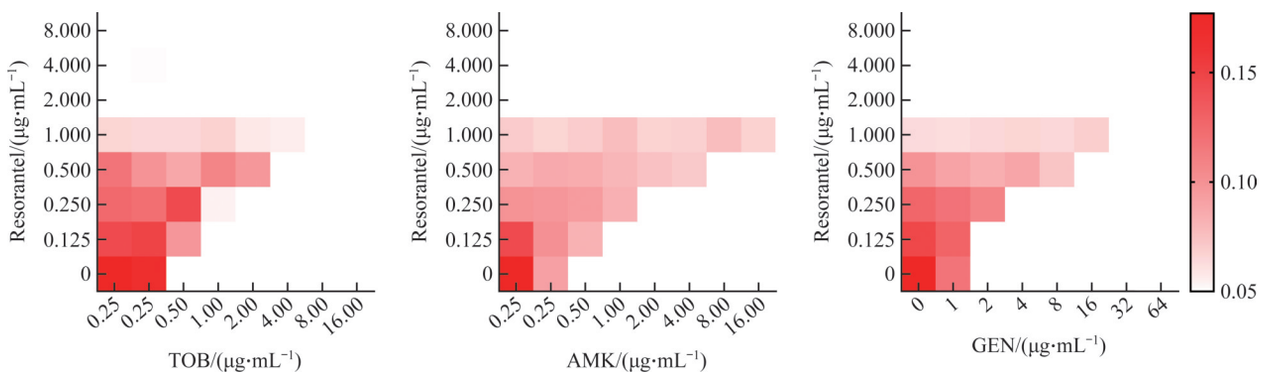


图3　雷琐太尔与氨基糖苷类抗生素联用对表皮葡萄球菌的棋盘试验热图

Figure 3　Checkerboard assay heatmap of resorantel in combination with aminoglycoside antibiotics against *Staphylococcus epidermidis*

Color intensity reflects the absorbance at 630 nm, which indicates bacterial growth. Darker shades represent higher bacterial growth and lower inhibitory efficacy. TOB: Tobramycin; AMK: Amikacin; GEN: Gentamicin.

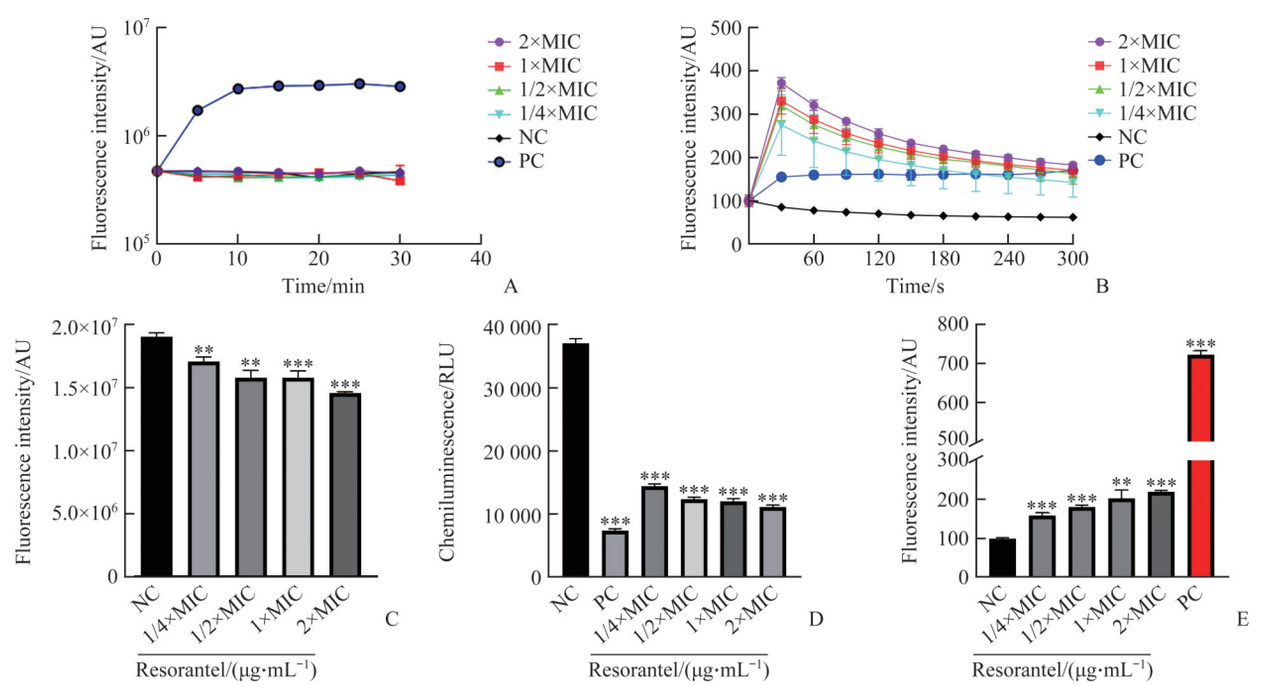


图4　雷琐太尔对表皮葡萄球菌细胞膜与能量代谢的作用

Figure 4　Effects of resorantel on the cell membrane and energy metabolism of *Staphylococcus epidermidis*

A: Detection of membrane permeability using the SYTO X Green fluorescent probe. Increased fluorescence intensity indicates increased membrane permeability. B: Detection of membrane potential using the $DiSC_3(5)$ fluorescent probe. Increased fluorescence intensity indicates membrane depolarization (loss of membrane potential). C: Detection of intracellular pH in bacteria using the BCECF-AM fluorescent probe. Decreased fluorescence intensity indicates a decrease in intracellular pH. D: Detection of intracellular ATP level using an enhanced ATP assay kit. Decreased chemiluminescence indicates a reduction in intracellular ATP level. E: Detection of bacterial cell membrane integrity using the propidium iodide staining. Increased fluorescence intensity indicates loss of membrane integrity. Results are expressed as mean±standard deviation. Comparisons between 2 groups are performed using Student's t-test. Compared with the NC, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001. NC: Negative control, bacteria treated with DMSO (0.1%, vol/vol). PC: Positive control, bacteria treated with 4 μg/mL melittin; AU: Arbitrary units; RLU: Relative light units; ATP: Adenosine triphosphate.

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

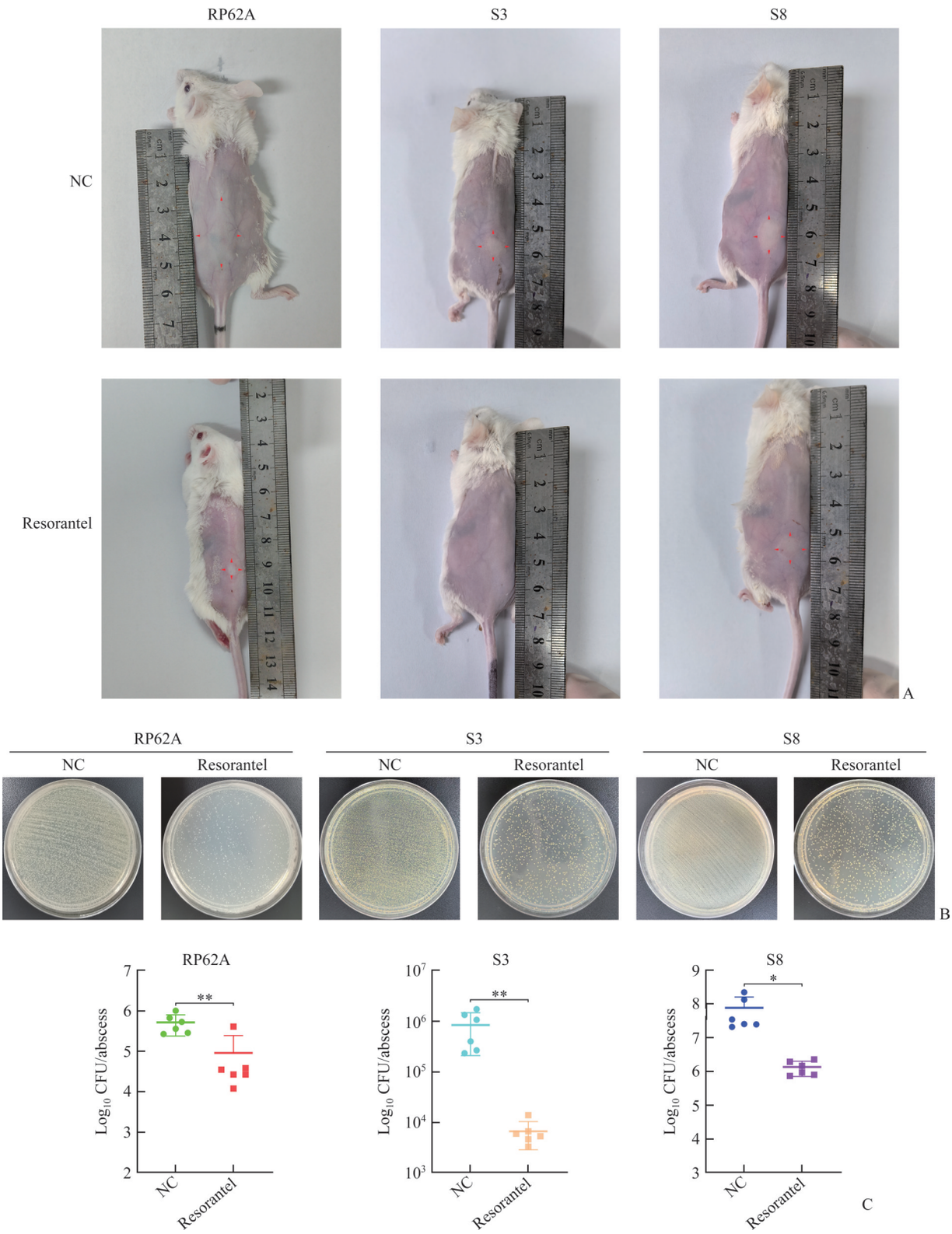


图5 雷琐太尔的体内抗菌效果

Figure 5 In vivo antibacterial effect of resorantel

A: Representative abscess images of the NC group and the 30 mg/kg resorantel treatment group. B: Representative images of bacterial colonies in the abscess. C: Quantitative bacterial load after resorantel treatment. Results are expressed as mean±standard deviation. Comparisons between 2 groups are performed using Student's *t*-test. **P*<0.05, ***P*<0.01. NC: Negative control, treated with DMSO (0.5%, vol/vol).

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

3 讨　论

本研究首次证明，雷琐太尔对多种表皮葡萄球菌菌株及临床分离株均具有显著的抑菌和抗生物膜活性。雷琐太尔传统上作为抗寄生虫药物使用，但近年来药物再利用策略已引起广泛关注。在本研究中，雷琐太尔对表皮葡萄球菌的MIC为2 μg/mL，提示其作为抗微生物药物具有较大的临床应用潜力。

表皮葡萄球菌易在医疗器械表面形成生物膜，即使使用高剂量抗生素也难以根除。本研究发现，雷琐太尔不仅能抑制该菌生物膜的形成，还能有效清除已形成的生物膜。机制研究表明，雷琐太尔可破坏细菌的质子动力势。质子动力势是细菌多种生物学过程的核心驱动力，如ATP合成、信号转导、运动和分子主动转运。ATP作为细胞的能量货币，在细菌中主要由ATP合酶合成，该过程依赖质子动力势所储存的电化学势能。因此，质子动力势一旦被破坏，将直接且不可避免地抑制ATP合成[16]。

质子动力势对于细菌的表型抗生素耐受性至关重要，并且与生物膜形成及高耐药持留菌的产生密切相关。生物膜的形成受群体感应信号调控，其中质子动力势的变化是细菌感知环境压力并启动生物膜程序的重要信号[17-18]。生物膜内部的代谢梯度是其具有防御优势的关键：外层细菌代谢活跃(质子动力势高)，对抗生素敏感；内层细菌代谢休眠(质子动力势低)，易对抗生素产生耐药[19]。常规抗生素通常只能杀灭活跃细菌，难以清除休眠菌。雷琐太尔通过破坏质子动力势，一方面直接抑制细胞外基质合成、削弱生物膜结构，另一方面消除质子动力势在生物膜内的异质性梯度，从而能够穿透生物膜、无差别杀伤各层细菌，最终克服生物膜对抗生素的耐受性。

氨基糖苷类抗生素(如GEN、TOB、AMK)对质子动力势干扰物表现出拮抗作用。这是因为氨基糖苷类药物为带正电荷的多阳离子分子，依赖细菌细胞膜的电化学梯度通过主动转运进入细胞，进而结合30S核糖体亚基，干扰蛋白质的合成[20]。在本研究中，雷琐太尔与氨基糖苷类抗生素联用呈现拮抗现象，提示两者可能作用于相同或相近的细胞通路，其具体机制仍需进一步研究。本研究揭示了雷琐太尔的一种新抗菌作用模式——破坏跨膜质子动力势。此外，雷琐太尔具有快速的抑菌活性和较低的耐药概率，这可能与其具有多种抑菌靶点有关。

尽管本研究数据表明，在由表皮葡萄球菌生物膜形成菌株RP62A诱导的脓肿模型中，雷琐太尔表现出有效的体内抗菌活性，但其作为抗菌剂的安全性仍有待进一步评估。未来工作需优化雷琐太尔的分子结构，以提高其抗菌效力并尽可能降低其毒性。此外，还需将体内研究扩展至其他感染模型，以验证其在多种感染环境中的有效性。若上述研究取得成功，雷琐太尔有望成为一种新型高效的抗菌剂，尤其适用于治疗难以根除的生物膜相关感染。综上所述，雷琐太尔的抗菌活性及抗生物膜特性使其成为开发新型抗生素的优良候选药物。

作者贡献声明：郭绍伟　研究设计与实施，数据分析，论文撰写与修改；黄冠清、肖丹、陆丽华　数据采集；李梦娜、李懿敏　数据分析；伍勇　研究设计，论文指导与修改，经费支持。所有作者阅读并同意最终的文本。

利益冲突声明：作者声称无任何利益冲突。

参考文献

[1] Severn MM, Horswill AR. Staphylococcus epidermidis and its dual lifestyle in skin health and infection[J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21(2): 97-111. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00780-3.

[2] Burke Ó, Zeden MS, O'Gara JP. The pathogenicity and virulence of the opportunistic pathogen Staphylococcus epidermidis[J]. Virulence, 2024, 15(1): 2359483. https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2359483.

[3] Hirose M, Aung MS, Fujita Y, et al. Prevalence, genetic characteristics, and antimicrobial resistance of staphylococcal isolates from oral cavity and skin surface of healthy individuals in northern Japan[J]. J Infect Public Health, 2024, 17(8): 102488. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2024.102488.

[4] Sung K, Park M, Chon J, et al. Concentration-dependent global quantitative proteome response of Staphylococcus epidermidis RP62A biofilms to subinhibitory tigecycline[J]. Cells, 2022, 11(21): 3488. https://doi.org/10.3390/cells11213488.

[5] DeCory HH, Sanfilippo CM, Proskin HM, et al. Characterization of baseline polybacterial versus monobacterial infections in three randomized controlled bacterial conjunctivitis trials and microbial outcomes with besifloxacin ophthalmic suspension 0.6[J/OL]. PLoS One, 2020, 15(8): e0237603[2025-09-01]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237603.

[6] Pouget C, Chatre C, Lavigne JP, et al. Effect of antibiotic exposure on *Staphylococcus epidermidis* responsible for catheter-related bacteremia[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1547. https://doi.org/10.3390/ijms24021547.

[7] Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 14. https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014.

[8] Salgueiro VC, Iorio NLP, Ferreira MC, et al. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.

Staphylococcus epidermidis isolates from neonates[J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1): 15. https://doi.org/10.1186/s12866-017-0930-9.

[9] Peixoto PB, Massinhani FH, Netto Dos Santos KR, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with reduced vancomycin susceptibility from bloodstream infections in a neonatal intensive care unit[J]. J Med Microbiol, 2020, 69(1): 41-45. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001117.

[10] She PF, Yang YF, Liu SS, et al. Repurposing pinaverium bromide against *Staphylococcus* and its biofilms with new mechanisms[J]. AMB Express, 2024, 14(1): 141. https://doi.org/10.1186/s13568-024-01809-x.

[11] Swan GE. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals[J]. J S Afr Vet Assoc, 1999, 70(2): 61-70. https://doi.org/10.4102/jsava.v70i2.756.

[12] Gruss B, Malan FS, Roper NA, et al. The anthelmintic efficacy of resorantel against cestodes in sheep[J]. J S Afr Vet Assoc, 1988, 59(4): 204-205.

[13] Gupta RP, Malik PD, Gautam OP. Efficacy of resorantel against paramphistomiasis in naturally infected sheep[J]. Trop Anim Health Prod, 1981, 13(1): 35-36. https://doi.org/10.1007/BF02237884.

[14] Yang B, Tong Z, Shi J, et al. Bacterial proton motive force as an unprecedented target to control antimicrobial resistance[J]. Med Res Rev, 2023, 43(4):1068-1090.https://doi.org/10.1002/med.21946.

[15] Tosh C, Tec M, White JB, et al. A Bayesian active learning platform for scalable combination drug screens[J/OL]. Nat Commun, 2025, 16(1): 156. https://doi.org/10.1038/s41467-024-55287-7.

[16] Blanc FEC, Hummer G. Mechanism of proton-powered c-ring rotation in a mitochondrial ATP synthase[J/OL]. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, 121(11): e2314199121[2025-09-01]. https://doi.org/10.1073/pnas.2314199121.

[17] Bruni GN, Kralj JM. Membrane voltage dysregulation driven by metabolic dysfunction underlies bactericidal activity of aminoglycosides[J/OL]. eLife, 2020, 9: e58706[2025-09-01]. https://doi.org/10.7554/eLife.58706.

[18] Juszczuk-Kubiak E. Molecular aspects of the functioning of pathogenic bacteria biofilm based on *Quorum sensing* (QS) signal-response system and innovative non-antibiotic strategies for their elimination[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(5): 2655. https://doi.org/10.3390/ijms25052655.

[19] Caño Muñiz SE, Trigg S, Hardo G, et al. Metabolic control of porin permeability influences antibiotic resistance in *Escherichia coli*[J]. Nat Microbiol, 2025, 10(12): 3202-3214. https://doi.org/10.1038/s41564-025-02175-5.

[20] Chulluncuy R, Espiche C, Nakamoto JA, et al. Conformational response of 30S-bound IF3 to A-site binders streptomycin and kanamycin[J]. Antibiotics, 2016, 5(4): 38. https://doi.org/10.3390/antibiotics5040038.

（责任编辑 郭征）

©Journal of Central South University (Medical Science). All rights reserved.