

复方黄柏液涂剂对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌毒力和生物膜的影响

李金泽¹, 崔开宇², 李东影², 马淑骅², 贺改英², 孙娅楠², 王毅², 何忠梅^{1*}, 杨伟峰^{2*}

(1. 吉林农业大学, 长春 130118; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究复方黄柏液涂剂(FFHBFP)对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)毒力和生物膜的抑制作用,发现FFHBFP对MRSA的抗菌作用,为临床指导用药提供理论依据与参考。方法:首先采用微量稀释法和时间-生长曲线测定FFHBFP和万古霉素(VAN)对MRSA的最低抑菌浓度(MIC)和对细菌生长的影响;而后选择亚抑菌浓度(sub-MIC)分别观察FFHBFP和VAN对MRSA毒力因子脂肪酶的抑制能力和恢复过氧化氢(H₂O₂)敏感性能力;采用微孔板法检测FFHBFP和VAN对MRSA生物膜形成期和成熟期的抑制能力;应用扫描电子显微镜(SEM)观察给药前后成熟生物膜在细菌形态方面的变化;结合实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测生药质量浓度50.600 g·L⁻¹ FFHBFP对MRSA毒力基因crtM和生物膜形成基因fnbA、icaA表达的影响,最后运用分子对接技术预测FFHBFP中潜在抗菌有效成分与MRSA毒力和生物膜的作用靶点机制。结果:VAN的MIC为2 mg·L⁻¹,在1 mg·L⁻¹以下时不影响MRSA生长,而FFHBFP无法测定出MIC,在生药质量浓度101.200~202.400 g·L⁻¹时对生长有抑制作用;相比于空白组和VAN组,sub-MIC(生药质量浓度25.300~50.600 g·L⁻¹)具有显著抑制脂肪酶和恢复MRSA对H₂O₂敏感($P<0.01$);微孔板法结果显示FFHBFP(生药质量浓度25.300~202.400 g·L⁻¹)对生物膜形成期和成熟期均有明显抑制作用($P<0.05$, $P<0.01$);SEM显示FFHBFP使生物膜结构疏松,菌体大小不一;生药质量浓度50.600 g·L⁻¹质量浓度FFHBFP能显著抑制相关的毒力基因和生物膜形成基因的表达($P<0.05$, $P<0.01$),同时分子对接结果也显示FFHBFP主要抗菌活性成分对作用靶点有较好的结合能力。结论:FFHBFP对MRSA没有直接杀灭的能力,而是通过削弱毒力表达和生物膜形成等致病能力来发挥临床疗效。

[关键词] 复方黄柏液涂剂;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;毒力因子;生物膜

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0054-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220609

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220120.1109.004.html>

[网络出版日期] 2022-01-20 16:35

Effect of Fufang Huangbai Fluid Paint on Virulence and Biofilm of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

LI Jin-ze¹, CUI Kai-yu², LI Dong-ying², MA Shu-hua², HE Gai-ying², SUN Ya-nan², WANG Yi²,

HE Zhong-mei^{1*}, YANG Wei-feng^{2*}

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the virulence and biofilm inhibition effect of Fufang Huangbai Fluid Paint (FFHBFP) on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and to explore the antibacterial effect

[收稿日期] 2021-12-03

[基金项目] 科技部“中医药现代化研究”重点专项(2019YFC1709305);中国中医科学院科技创新工程中西医结合基础重大攻关项目(CI2021A00601);李连达院士工作站专项经费项目(HX2017001);中国中医科学院医学实验中心基本科研业务项目(zz2018018);北京自然科学基金面上项目(7192141)

[第一作者] 李金泽,在读硕士,从事中药抗菌机制研究,E-mail:651085563@qq.com

[通信作者] *何忠梅,教授,从事中药有效成分、作用机制及产品开发生效研究,E-mail:heather78@126.com;

*杨伟峰,副研究员,从事中药抗菌机制研究,Tel:010-64789506,E-mail:452040236@qq.com

of FFHBFP on MRSA, which provides a theoretical basis and reference for clinical medication. **Method:** Firstly, the microdilution method and time - growth curve were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of FFHBFP and vancomycin (VAN) against MRSA and the effect on bacterial growth. The effects of FFHBFP and VAN on the inhibition of MRSA virulence factor lipase and restoration of hydrogen peroxide (H_2O_2) sensitivity were detected under sub-minimum inhibitory concentration (sub-MIC). The inhibitory effect of FFHBFP and VAN on MRSA biofilm formation and maturation was detected by the microplate method. The morphological changes of mature biofilms before and after administration were observed under a scanning electron microscope (SEM). Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was utilized to detect the effect of $50.600\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration of FFHBFP on the expression of MRSA virulence gene *crtM* and biofilm-forming genes *fnbA* and *icaA*. Finally, molecular docking technology was used to predict the mechanism of potential antibacterial active ingredients of FFHBFP in inhibiting the virulence and biofilm of MRSA. **Result:** The MIC of VAN was $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and VAN below $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ exerted no effect on MRSA growth. The MIC of FFHBFP was not determined, while the $101.200\text{-}202.400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ original solution inhibited MRSA growth. Compared with the blank group and the VAN group, sub-MIC ($25.300\text{-}50.600\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ original solution) inhibited lipase and recovered MRSA sensitivity to H_2O_2 ($P<0.01$). The results of the microplate method showed that FFHBFP ($25.300\text{-}202.400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ original solution) inhibited biofilm formation and maturation ($P<0.05$, $P<0.01$). The SEM exhibited that FFHBFP made the structure of biofilm loose and the size of the bacteria varied. FFHBFP at $50.600\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration can inhibit the expression of related virulence genes and biofilm-forming genes ($P<0.05$, $P<0.01$), and molecular docking results also showed that the main antibacterial active ingredients in FFHBFP have good binding ability to the target. **Conclusion:** FFHBFP that cannot directly kill MRSA exerts clinical efficacy by impairing virulence expression, biofilm formation, and other pathogenic properties.

[Keywords] Fufang Huangbai Fluid Paint (FFHBFP); methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; virulence factor; biofilm

糖尿病足(DF)是糖尿病患者的严重并发症之一,发病过程较为复杂,多由下肢远端神经病变、血管病变和感染所致,具有较高的发病率、致残率和高昂的医疗费用^[1]。据统计,我国50岁以上的糖尿病患者的DF发病率高达8.1%,是引起非创伤性截肢的主要原因^[2]。目前,临床治疗DF常采用清创、抗菌敷料和局部应用抗生素等措施,但由于细菌耐药日趋严重,给DF的临床治疗带来极大的困扰,寻找能够从不同环节抑制耐药菌,且不引起细菌耐药的抗感染药物是DF临床治疗急需解决的问题。

DF并发的感染在早期和急性感染中以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)较为常见,由于DF患者存在微血管病变导致创面的药物浓度不足以完全抵抗细菌,因而诱导耐药菌株的出现,其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)的感染率逐年增高^[3-5]。MRSA不仅对 β -内酰胺类抗生素耐药,在感染过程中产生一系列毒力因子,包括表面毒力因子(如荚膜多糖、葡萄球菌黄素)和胞外毒力因子(如 α -溶血素、脂肪酶),

这些毒力因子涉及黏附、毒素分泌、免疫防御逃避等途径,与病情恶化密切相关^[6-8]。此外,生物膜的形成也是导致MRSA产生耐药性和感染持续的主要原因,相比于浮游菌,生物膜内的细菌可有效逃避宿主免疫反应且对抗菌药物的抗性更强^[9-10]。已有研究表明,针对DF感染治疗过程中受MRSA多药耐药及生物膜难以根除的问题,通过抗毒力策略、削弱细菌致病力和传播力,可达到缓解或者控制感染的治疗效果^[11]。

复方黄柏液涂剂(FFHBFP)是由连翘、黄柏、金银花、蒲公英、蜈蚣五味中药组成^[12],常用于治疗糖尿病足感染、疮疡溃后等,疗效显著^[13]。现已证实FFHBFP对多种细菌有确切的抑制效果^[14],低浓度(稀释10倍原液)FFHBFP具有促进转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),加快创面愈合的作用^[15]。但目前针对FFHBFP的抗菌作用机制尚不明确,因此本研究拟从复方FFHBFP对抑制MRSA侵袭感染中主要毒力因子表达和生物膜形成能力的角度,阐述其在临床糖尿病足感染治疗中的机制所在。

1 材料

1.1 菌株 MRSA(批号 ATCC 43300)购自美国模式培养物库。

1.2 药物 FFHBFP(批号 20031212,山东汉方制药有限公司);万古霉素(VAN,批号 D277006,西班牙 LILLY S.A.公司)。

1.3 试剂 XTT 钠盐(XTT)、甘油三丁酸酯(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 A19D11L1350 18、Y03S11X122350);吩嗪硫酸甲酯(PMS,美国 Sigma 公司,批号 P9625);过氧化氢溶液(H_2O_2 ,北京海德润医药集团有限公司,批号 0101002);MH 肉汤、胰蛋白胨、酵母提取物(美国 Oxoid 公司);琼脂、氯化钠、葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司);结晶紫(CV,美国 Solarbio 公司);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,购自北京博奥拓达科技有限公司);细菌总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号 W9702];ReverTra Ace™ 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)逆转录(RT)Master Mix 和 SYBR®Green Real-time PCR Master Mix[东洋纺(上海)生物科技有限公司,批号分别为 061000、132800];LB 培养基(氯化钠 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,胰蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,酵母提取物 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,超纯水配制);LB 固体培养基(氯化钠 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,胰蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,酵母提取物 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,超纯水配制);含糖 LB 培养基(葡萄糖 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,氯化钠 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,胰蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,酵母提取物 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,超纯水配制);XTT-PMS 溶液($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ XTT 与 $3.06\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PMS 按 200:1 混合,避光保存);0.4%CV 溶液($CV\ 4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,超纯水配制)。

1.4 仪器 SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);THZ-D 型恒温振荡培养箱(苏州培英实验设备有限公司);KBF-240 型恒温培养箱(德国 Binder 公司);V-1100 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);S-3400N 型扫描电子显微镜(日本日立公司);Synergy H1 型酶标仪、ELX50 型全自动八道洗板机(美国 BioTek 有限公司);Allegra X-15R 医用离心机(美国 Beckman Coulter 有限公司);NanoDrop One 型超微量分光光度计(美国 Thermo 公司);CFX Connect™ 型 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 最低抑菌浓度(MIC)测定^[16] 挑取 MRSA 单菌落置于 LB 培养基 4 mL 中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $280\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 16~18 h,测定其吸光度 A_{600} 值并用 MH 培养基稀释

至 0.02,采用微量稀释法在 96 孔板中将 FFHBFP 和 VAN 进行 2 倍稀释,使 FFHBFP 最终质量浓度为生药质量浓度^[14] $101.200\sim 0.791\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,VAN 最终质量浓度为 $8\sim 0.0625\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每孔稀释药液各 $100\text{ }\mu\text{L}$ 和稀释菌液 $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h。每孔加 TTC $30\text{ }\mu\text{L}$,放置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 30 min,取出,观察颜色变化。

2.2 FFHBFP 对 MRSA 时间-生长曲线的测定^[17]

挑取 MRSA 单菌落置于 4 mL LB 培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $280\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养后,将过夜培养物按照 1:100 接种到 10 mL LB 培养基中。在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $280\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 扩大培养 0.5 h 后,倍比稀释药液,使 FFHBFP 最终质量浓度为生药质量浓度 101.200、50.600、25.300 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,VAN 最终质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,空白组选用 LB 培养基,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $280\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下培养并每隔 2 h 取菌液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 用酶标仪检测 A_{600} 值,实验重复 3 次。

2.3 FFHBFP 对 MRSA 毒力因子的影响

2.3.1 脂肪酶测定^[18] 挑取 MRSA 单菌落置于 4 mL LB 培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $280\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养后,结合 2.1 项和 2.2 项实验结果,将菌液 $2\text{ }\mu\text{L}$ 接种在含有不同浓度且不影响 MRSA 生长 FFHBFP 和 VAN 浓度的 1% 三丁酸甘油酯 LB 琼脂平板上, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h,观察透明圈的大小,实验重复 3 次。

2.3.2 过氧化氢敏感性实验^[7] 挑取 MRSA 单菌落置于 4 mL LB 培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $280\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养后,测定其 A_{600} 值并稀释至 0.2,备用。结合 2.1 项和 2.2 项实验结果选择对 MRSA 生长无影响的 FFHBFP 和 VAN 浓度,通过倍比稀释药液,并将稀释菌液与稀释药液 1:1 混匀,使 FFHBFP 最终质量浓度为生药质量浓度 50.600、25.300 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,阳性药 VAN 组最终质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,空白组选用 LB 培养基,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $280\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h。用无菌 PBS 漂洗 2 次,并将其稀释至 A_{600} 值为 1,确保起始的细菌数量一致,并向细菌悬液中加入最终浓度为 1.5% 的 H_2O_2 ,并在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 15 min。孵育后,取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 涂在 LB 平板上,以计数存活的菌落数,实验重复 3 次。

2.4 微孔板法检测 FFHBFP 对 MRSA 生物膜的影响^[19-20]

2.4.1 形成期 取 MRSA 单菌落置于 4 mL LB 培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $280\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养后,用含糖 LB 培养基(0.25% 葡萄糖)将菌液稀释至 A_{600} 值为 0.1,备用。在 96 孔板中对药液进行 2 倍稀释,各浓度梯度做 2 个复孔,每孔加入稀释菌液 $100\text{ }\mu\text{L}$,使

FFHBFP最终质量浓度为生药质量浓度6.325~202.400 g·L⁻¹, VAN最终质量浓度为1.25~40 mg·L⁻¹并在37℃培养24 h。用0.9%氯化钠洗板2次,除去孔中的浮游菌。加入0.4% CV和XTT-PMS试剂对孔内生物膜进行染色,并用酶标仪检测总菌量(CV 590 nm)和活菌量(XTT-PMS 450 nm、655 nm)的A值。

2.4.2 成熟期 取MRSA单菌落置于4 mL LB培养基,37℃、280 r·min⁻¹过夜培养后,用含糖LB培养基(0.25%葡萄糖)将菌液稀释至A₆₀₀值为0.1,并在96孔板中每孔加稀释菌液100 μL,37℃培养24 h后去除孔中的浮游菌。将药液进行2倍稀释,使FFHBFP最终浓度为生药6.325~202.400 g·L⁻¹, VAN最终质量浓度为1.25~40 mg·L⁻¹,各浓度梯度做2个复孔,每孔加入100 μL稀释药液,37℃继续培养24 h。用0.9%氯化钠洗板2次,分别加入0.4% CV和XTT-PMS试剂并用酶标仪检测总菌量(CV 590 nm)和活菌量(XTT-PMS 450 nm、655 nm)的A值。

2.5 扫描电镜观察MRSA成熟生物膜形态 在12孔板中放入1 cm×1 cm的无菌载玻片,加入稀释菌液1 mL(A₆₀₀=0.1),37℃培养24 h,使生物膜生长在载玻片上。吸取上清液,加入FFHBFP(生药质量浓度101.200~202.400 g·L⁻¹)1 mL和VAN(10 mg·L⁻¹),空白组加入1 mL含糖LB培养基,37℃继续培养24 h。用PBS清洗2次,除去浮游细菌。4%戊二醛固定,乙醇梯度脱水,将载玻片真空冷冻干燥、喷金后,在扫描电镜下观察拍照。

2.6 Real-time PCR测定生药质量浓度50.600 g·L⁻¹质量浓度FFHBFP对MRSA毒力基因crtM和生物膜形成基因fmbA、icaA的相对表达水平 挑取MRSA单菌落置于4 mL LB培养基,37℃、280 r·min⁻¹过夜培养后,将过夜培养物按照1:100接种到10 mL LB培养基(空白组)和生药质量浓度50.600 g·L⁻¹质量浓度FFHBFP中培养至对数期,离心并用无菌PBS漂洗2次,收集菌体后液氮研磨,按照说明书提取RNA并逆转录成cDNA。内参基因16S rRNA和目的基因crtM、fmbA、icaA的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。Real-time PCR反应体系为蒸馏水6.4 μL,SYBR[®]Green Real-time PCR Master Mix 10 μL,上下游引物各0.8 μL,cDNA 2 μL。反应条件为95℃预变性30 s,95℃变性5 s,59℃退火10 s并延伸15 s,共40个循环。用2^{-ΔΔC_t}法分析目的基因相对表达量,引物序列

见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
16S rRNA	上游 GCTGCCCTTTGTATTGTC	179
	下游 AGATGTTGGGTTAAGTCCC	
crtM	上游 ATGGTGTGCTGGTACAGTAGGTG	94
	下游 TCACCAAGTCTTCTTGCGACATCG	
fmbA	上游 AACACCAACGCCACCAACACC	84
	下游 TCTGGCTCACTCGGCACTTCTG	
icaA	上游 TCGACGTTGGCTACTGGGATACTG	109
	下游 CAACACATGGCAAGCGGTTTCATAC	

2.7 分子对接对FFHBFP中主要抗菌活性成分作用靶点的辨识^[21] 从RCSB PDB数据库中检索并下载脂肪酶(geh)、脱氢鲨烯合酶(crtM)、葡萄球菌附属调节因子A(sarA)蛋白并运用PyMOL软件对蛋白移去水分子和配体,保存为蛋白质结构PDB格式文件。从TCMSP中检索并下载FFHBFP主要抗菌活性成分小檗碱、连翘苷、绿原酸的化合物结构mol文件。将蛋白和化合物导入Swissdock平台进行分子对接验证,一般认为自由能(ΔG)越低,配体与受体结合越紧密。

2.8 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用SPSS 26.0软件进行t检验,多组间比较采用SPSS 26.0软件进行单因素方差分析,方差齐者用最小显著性差异法(LSD)进行两两比较,方差不齐的用Dunnett T3分析,以P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FFHBFP和VAN的MIC及其对MRSA的时间-生长曲线 VAN对MRSA的MIC值为2 mg·L⁻¹,而FFHBFP的MIC值未能测出。时间-生长曲线结果显示,与空白组比较,生药质量浓度25.300~50.600 g·L⁻¹质量浓度的FFHBFP和1 mg·L⁻¹ VAN对MRSA的生长无抑制作用,然而生药质量浓度101.200 g·L⁻¹的FFHBFP对MRSA的生长可产生一定程度地抑制作用。见表2和图1。

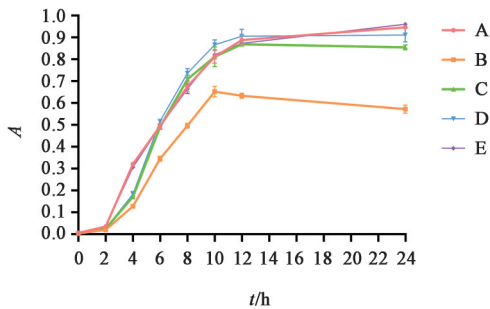
3.2 FFHBFP对MRSA毒力因子的影响

3.2.1 FFHBFP对MRSA脂肪酶的影响 根据3.1项实验结果选用对MRSA生长无抑制作用的生药质量浓度50.600 g·L⁻¹和25.300 g·L⁻¹质量浓度的FFHBFP进行脂肪酶测定,其产生的透明圈直径要比

表2 FFHBFP和VAN对MRSA的MIC检测

Table 2 Detection of minimum inhibitory concentration of FFHBFP and VAN on MRSA

药物名称	MIC
FFHBFP	-
VAN	2



注:A.空白组;B.101.200 g·L⁻¹ FFHBFP组;C.50.600 g·L⁻¹ FFHBFP组;D.25.300 g·L⁻¹ FFHBFP组;E.VAN组
图1 不同浓度FFHBFP和VAN对MRSA生长曲线的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of FFHBFP and VAN on growth curves of MRSA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

空白组的透明圈小($P<0.01$),而VAN组($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的透明圈与空白组比较差异无统计学意义,表明生药质量浓度 $50.600\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $25.300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度的FFHBFP能够抑制MRSA脂肪酶的产生。见表3。

表3 FFHBFP对MRSA脂肪酶的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of FFHBFP on lipase of MRSA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	透明圈直径/cm
空白组		0.88 ± 0.025
FFHBFP组	50.600	$0.63\pm 0.029^{2)}$
	25.300	$0.71\pm 0.052^{2)}$
VAN组	0.001	0.85 ± 0.050

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表4-表6同)

3.2.2 FFHBFP对过氧化氢敏感性的影响 经过 H_2O_2 处理后,可以观察到不同组均出现小菌落突变株(SCV),而且细菌数量都存在相应的减少。其中空白组细菌存活率为13.09%,FFHBFP组(生药质量浓度 $50.600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $25.300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)细菌存活率分别为0.06%和0.26%,而VAN组($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的细菌存活率为9.62%。与空白组比较,FFHBFP处理后的细菌更容易被 H_2O_2 杀灭($P<0.01$)。见表4。

3.3 FFHBFP对MRSA生物膜的影响

3.3.1 FFHBFP对MRSA生物膜形成期的影响 与空白组比较,亚抑菌浓度(sub-MIC)的FFHBFP(生药质量浓度 $101.200\sim 202.400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)对MRSA生物

表4 FFHBFP对 H_2O_2 中MRSA生存率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of FFHBFP on survival rate of MRSA in H_2O_2 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	H_2O_2 处理前($\times 10^6$) /CFU·mL ⁻¹	H_2O_2 处理后($\times 10^6$) /CFU·mL ⁻¹
空白组		323.33 ± 49.33	42.33 ± 3.69
FFHBFP组	50.600	273.33 ± 51.32	$0.16\pm 0.03^{2)}$
	25.300	216.67 ± 86.22	$0.57\pm 0.12^{2)}$
VAN组	0.001	206.67 ± 55.08	$19.60\pm 3.37^{2)}$

膜的总菌量有抑制作用($P<0.05$),当FFHBFP质量浓度为生药质量浓度 $25.300\sim 202.400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可以明显减少生物膜内的活菌量($P<0.01$),而VAN只有在高于MIC质量浓度($40\sim 2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时对生物膜的总菌量($P<0.05$)和活菌量($P<0.01$)有抑制作用。见表5。

表5 FFHBFP与VAN对MRSA生物膜形成的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of FFHBFP and VAN on formation of MRSA biofilm ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	CV(A_{590})	XTT(A_{450})
空白		1.67 ± 0.14	2.31 ± 0.01
FFHBFP	202.400	$0.35\pm 0.02^{1)}$	$0.94\pm 0.05^{2)}$
	101.200	$0.47\pm 0.03^{1)}$	$1.34\pm 0.05^{2)}$
	50.600	1.01 ± 0.04	$1.60\pm 0.07^{2)}$
	25.300	1.39 ± 0.15	$1.75\pm 0.05^{2)}$
	12.650	$1.06\pm 0.07^{1)}$	2.25 ± 0.06
	6.325	1.17 ± 0.15	$1.84\pm 0.09^{2)}$
VAN	40	$0.10\pm 0.01^{1)}$	$0.25\pm 0.02^{2)}$
	20	$0.10\pm 0.01^{1)}$	$0.23\pm 0.02^{2)}$
	10	$0.11\pm 0.00^{1)}$	$0.25\pm 0.01^{2)}$
	5	$0.10\pm 0.01^{1)}$	$0.24\pm 0.02^{2)}$
	2.5	$0.77\pm 0.14^{1)}$	$1.28\pm 0.06^{2)}$
	1.25	1.10 ± 0.12	1.96 ± 0.08

3.3.2 FFHBFP对MRSA生物膜成熟期的影响 当生物膜成熟后,与空白组比较,FFHBFP(生药质量浓度 $202.400\sim 6.325\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)可以有效抑制生物膜总菌量($P<0.05, P<0.01$),同时在生药质量浓度 $101.200\sim 202.400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度下又可以显著减少生物膜内的活菌量($P<0.01$),而VAN只有在个别高浓度下($20\sim 40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对MRSA生物膜的总菌量和活菌量有抑制作用($P<0.01$)。见表6。

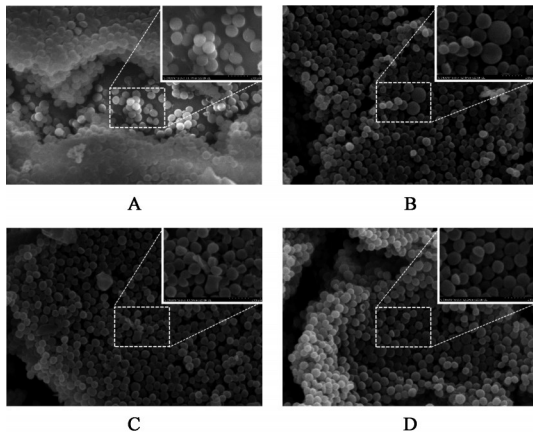
3.4 扫描电镜观察MRSA成熟生物膜形态变化

空白组细菌之间紧密结合聚集成团,被膜性结构包裹形成较厚的生物膜,膜内细菌个体形态正常,

表6 FFHBFP与VAN对成熟MRSA生物膜的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 6 Effect of FFHBFP and VAN on mature MRSA biofilm ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	CV(A_{590})	XTT(A_{450})
空白		2.05±0.05	1.68±0.09
FFHBFP	202 400	1.02±0.05 ²⁾	0.93±0.05 ²⁾
	101 200	1.65±0.22	0.91±0.11 ²⁾
	50 600	1.28±0.12 ¹⁾	1.36±0.18
	25 300	1.63±0.06 ²⁾	1.38±0.05
	12 650	1.62±0.08 ¹⁾	1.34±0.07
	6 325	1.78±0.04 ¹⁾	1.22±0.01
VAN	40	1.21±0.12 ²⁾	1.13±0.16 ²⁾
	20	2.03±0.18	1.33±0.21 ²⁾
	10	1.55±0.03 ²⁾	1.74±0.11
	5	2.21±0.18	1.78±0.09
	2.5	1.65±0.18 ²⁾	1.57±0.09
	1.25	2.04±0.24	1.54±0.10

大小均一。FFHBFP组(生药质量浓度202.400~101.200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)生物膜结构松散,细菌排列混乱,个体大小不一,可见体积增大的菌体以及破裂内容物渗出后干瘪的菌体。VAN组(10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)生物膜部分破裂但仍可见膜性结构,个体形态与空白组无明显差异。见图2。



注:A.空白组;B. FFHBFP组(生药质量浓度202.400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); C. 1/2 FFHBFP组(生药质量浓度101.200 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); D. VAN组(10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

图2 FFHBFP与VAN对MRSA成熟细菌生物膜的作用(扫描电镜, $\times 5\,000, \times 10\,000$)

Fig. 2 Effect of FFHBFP and VAN on mature biofilm of MRSA (SEM, $\times 5\,000, \times 10\,000$)

3.5 生药50.600 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度FFHBFP对MRSA毒力基因crtM和生物膜形成基因fnbA、icaA mRNA的表达影响 与空白组比较,经生药质量浓

度50.600 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度FFHBFP处理后的毒力基因crtM(0.91±0.03) mRNA表达明显下调($P<0.05$)和生物膜形成基因fnbA(0.39±0.03)、icaA(0.31±0.02) mRNA表达均显著下调($P<0.01$)。

3.6 分子对接技术考察FFHBFP主要抗菌活性成分抗毒力作用靶点的辨识 根据文献[22-23]分别选取FFHBFP中主要抗菌活性成分小檗碱、连翘苷、绿原酸分别对调控脂肪酶、过氧化氢敏感性及生物膜这3种毒力因子关键靶点geh、crtM、sarA进行分子对接,通过结合能(ΔG)大小辨识上述主要抗菌活性成分的可能作用靶点和预测FFHBFP抗菌机制。Swissdock对接结果显示(表7),连翘苷和绿原酸与这三种毒力因子关键靶点有良好的结合活性,小檗碱与crtM可以有效结合,但对geh和sarA结合能较低,见图3。以上结果表明FFHBFP中主要抗菌有效成分与MRSA作用靶点具有良好的结合能力。

表7 生物活性化合物与MRSA geh、crtM和sarA的结合效果
Table 7 Binding efficacy of bioactive compounds with geh, crtM, sarA of MRSA

主要成分	Estimated $\Delta G/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$		
	geh	crtM	sarA
小檗碱	-7.34	-8.30	-7.02
连翘苷	-9.63	-11.18	-9.65
绿原酸	-8.44	-8.28	-8.28

注:1 cal≈4.186 J

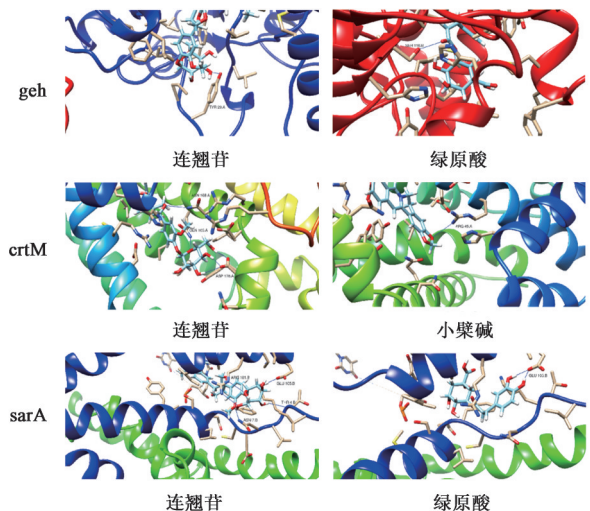


图3 生物活性化合物与geh、crtM和sarA的相互作用3D模式
Fig. 3 Three-dimensional representation of interaction patterns of bioactive compounds with geh, crtM, sarA

4 讨论

糖尿病患者长期存在微血管循环障碍和机体免疫功能低下,易使周围血管发生病变导致足部压

力异常,引起局部组织损伤并增加感染的风险,而且某些微生物在高糖环境下毒性增强,从而加重创面感染^[24]。*S. aureus*作为DF并发感染中常见细菌,在感染过程中可分泌多种毒力因子,对疾病的转归和进程起到至关重要的作用,其中由geh基因编码的脂肪酶可以改变局部炎症环境,干扰宿主免疫细胞吞噬能力^[25],促进生物膜形成^[26],从而赋予MRSA致病性和持久性的能力;受患者创面处免疫细胞过量释放而使活性氧水平增高的影响^[27],由crtMNOPQ操纵合成的葡萄球菌黄素可以增强MRSA对活性氧的抗性,在细菌对抵抗宿主免疫系统防御中发挥重要的作用^[28-29]。此外,细菌生物膜的形成在疾病的转归、进展中发挥重要的作用,MRSA的生物膜形成由胞外多糖黏附素(PIA)介导并受sarA和黏附相关的ica操纵子、fmbA等基因编码调控,当生物膜形成后会导致抗生素的渗透性变差,难以进入膜内发挥药效;逃避宿主免疫反应,导致患处反复感染形成慢性伤口,使糖尿病足的治疗具有挑战性^[30-32]。在DF感染治疗中,受体内药物代谢ADME和下肢血管病变的影响,病患处抗生素浓度有时处于sub-MIC而非MIC^[5,33],且在sub-MIC浓度下的抗生素不仅会增强*S. aureus*的溶血活性^[34],促进毒力因子表达^[35],还会刺激生物膜的形成^[36],诱导耐药的产生^[37]。

FFHBFP由连翘、黄柏、蒲公英、金银花和蜈蚣组成,其中连翘散结排脓、清热解毒,黄柏解毒疗疮、清热燥湿,共为君药;蒲公英、金银花共为臣药,可增强连翘、黄柏的排脓、解毒之功;蜈蚣退炎治疮、攻毒散结。诸药合用可共奏消肿止痛、祛腐生肌和清热解毒之功效^[13]。研究表明FFHBFP具有抗感染、消炎作用,有利于清除创面致病菌,控制、预防感染,促进坏死组织自溶,促进肉芽组织生成和创面愈合^[38-40]。其中连翘苷可以抑制*S. aureus*刺激巨噬细胞所引起的炎症反应^[41],绿原酸通过改变*S. aureus*细胞膜通透性,减少蛋白合成发挥抗菌机制^[42],然而以往研究中主要还是聚焦在中药抗菌活性上,细菌在致病过程中所分泌的毒力因子也是导致病情恶化的主要因素,中药许多单体成分在高浓度时才能发挥直接杀菌作用,但在临床治疗过程中药物浓度是很难维持在杀菌浓度范围内,所以推测高MIC的中药单体成分可能是通过抑制细菌毒力因子分泌而发挥临床治疗作用。目前针对中药抑制*S. aureus*致病过程中所产生的毒力因子方面的研究较少,因此,本研究侧重于MRSA的毒力因子表

达以及生物膜形成等角度,综合评价FFHBFP的抗菌作用。

本研究结果表明,和常规抗生素比较,FFHBFP虽未表现出对MRSA的直接杀灭作用,但sub-MIC的FFHBFP能够显著抑制脂肪酶的分泌,同时可增强MRSA对活性氧的敏感性,这些结果提示FFHBFP对MRSA致病的主要毒力因子具有显著抑制作用,Real-time PCR结果提示其抑制作用与crtM mRNA的表达密切相关。与FFHBFP不同,经典抗生素VAN抑制MRSA毒力因子表达较弱,主要通过直接杀灭MRSA而发挥疗效。分子对接结果表明,FFHBFP中主要抗菌活性成分小檗碱、连翘苷、绿原酸与geh、crtM、sarA毒力因子靶点均有良好地结合能力,特别是连翘苷的结合性较高,推测连翘苷可以作为抑制MRSA毒力因子表达的有效化合物。本实验同时也探讨了FFHBFP对MRSA生物膜形成期和成熟期的影响,结果表明,sub-MIC下FFHBFP对生物膜有显著的抑制效果,Real-time PCR结果也提示与生物膜形成相关的fmbA、icaA mRNA表达抑制密切相关,而VAN只有在高于MIC浓度时才能发挥抑制作用,特别是当生物膜成熟后,FFHBFP能使生物膜结构疏松更利于抗生素的渗透从而提高治疗效果。因此,与化药类抗生素相比,FFHBFP抗菌作用并非直接杀灭或抑制细菌,而是通过削弱细菌毒力的表达、生物膜的形成等抗细菌毒力因子环节发挥作用产生疗效,由于FFHBFP对细菌生长的选择压力影响较小,因而其对细菌耐药性的诱导作用也弱于传统杀菌类抗生素。FFHBFP对MRSA致病过程中主要毒力因子的抑制作用及对生物膜形成的影响,可有效改善DF患者局部感染,促进疾病的转归,这与其在临床DF治疗中对控制或预防感染,促进创面愈合方面直接相关。综上,FFHBFP对MRSA毒力因子和生物膜形成的抑制作用见图4。

现有研究已经证实细菌感染是导致创面愈合缓慢的主要原因,抗感染是DF治疗过程中的重中之重。但随着多重耐药菌的出现,使得临床上常用抗生素的药效不断减弱。因此,迫切需要找到能够减少抗生素引发细菌耐药性的新药物和新方法。这其中减轻细菌生存的压力、减缓压力诱导下的细菌耐药性产生,抑制细菌毒素的合成和释放、缓解细菌毒力因子对机体的损伤等方法被运用于抗菌新药研究和临床治疗。而我国中药资源丰富,中药在疾病防治中具有显著的抗菌作用、不易产生耐药

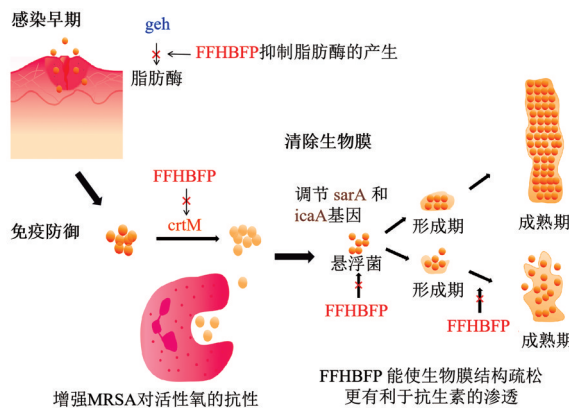


图4 FFHBFP对MRSA毒力因子和生物膜形成的作用示意

Fig. 4 Schematic diagram of effect of FFHBFP on MRSA virulence factors and biofilm formation

性、毒性作用小等优点,在抗感染治疗中具有良好应用前景^[43-44]。本研究评估了FFHBFP对MRSA毒力和生物膜的抑制潜力,有助于为临床指导用药提供理论依据与参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 谷涌泉. 中国糖尿病足诊治指南[J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(1): 19-27.

[2] 王富军. 中国糖尿病足防治指南(2019版)解读[J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(11): 1241-1245, 1250.

[3] DöRR S, FREIER F, SCHLECHT M, et al. Bacterial diversity and inflammatory response at first-time visit in younger and older individuals with diabetic foot infection (DFI) [J]. Acta Diabetol, 2021, 58(2): 181-189.

[4] SPICHLER A, HURWITZ B L, ARMSTRONG D G, et al. Microbiology of diabetic foot infections: From Louis Pasteur to 'crime scene investigation' [J]. BMC Med, 2015, 13(1): 2.

[5] ELEFThERiADOU I, TENTOLOURIS N, ARGIANA V, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diabetic foot infections [J]. Drugs, 2010, 70(14): 1785-1797.

[6] OTTO M. MRSA virulence and spread [J]. Cell Microbiol, 2012, 14(10): 1513-1521.

[7] SELVARAJA A, JAYASREE T, VALLIAMMAI A, et al. Myrtenol attenuates MRSA biofilm and virulence by suppressing sarA expression dynamism [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2027.

[8] 刘邦慧. 金黄色葡萄球菌 Rsp 调控毒力基因表达的分子机制 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2020.

[9] MCCARTHY H, RUDKIN J K, BLACK N S, et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in

Staphylococcus aureus [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 1.

[10] CASCIO FERRO S, CARBONE D, PARRINO B, et al. Therapeutic strategies to counteract antibiotic resistance in MRSA biofilm-associated infections [J]. ChemMedChem, 2021, 16(1): 65-80.

[11] DUNYACH-REMY C, NGBA ESSEBE C, SOTTO A, et al. *Staphylococcus aureus* toxins and diabetic foot ulcers: Role in pathogenesis and interest in diagnosis [J]. Toxins (Basel), 2016, 8(7): 209.

[12] 孙绪丁, 秦承雪. 复方黄柏液涂剂药理作用及其儿科的临床应用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(2): 31-33.

[13] 姚俊, 赵霞. 复方黄柏液最新临床应用进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(3): 308-312, 337.

[14] 孙绪丁, 刘振勋, 樊苗, 等. 复方黄柏液涂剂体外抑菌效果研究 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(9): 9-10.

[15] 孙绪丁, 刘振勋. 复方黄柏液涂剂促愈药理活性研究 [J]. 中国处方药, 2020, 18(1): 34-35.

[16] 马建凤, 刘华钢, 朱丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 42-45.

[17] YUAN Z, DAI Y, OUYANG P, et al. Thymol Inhibits biofilm formation, eliminates pre-existing biofilms, and enhances clearance of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse peritoneal implant infection model [J]. Microorganisms, 2020, 8(1): 99.

[18] 鲍燕. 金黄色葡萄球菌 Pfs 的功能性研究及金葡萄感染的靶向性治疗 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2012.

[19] 雷洪涛, 刘敏彦, 欧阳竞锋, 等. 莲花清瘟胶囊抗金黄色葡萄球菌生物膜研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 161-164.

[20] 刘珏玲. 痰热清注射液对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的作用及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2017.

[21] 曾丽莹, 邓伊健, 陈洁瑜, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨四妙丸治疗高尿酸血症的作用机制 [J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(4): 579-587.

[22] 肖芳, 翟丽杰, 柴劲. 一测多评法测定复方黄柏液涂剂中 8 种活性成分 [J]. 中国药师, 2019, 22(5): 955-959.

[23] 王玉团, 许丽丽, 徐丽华. HPLC-PAD 法同时测定复方黄柏液涂剂中 9 种成分的含量 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(12): 1649-1652.

[24] SAEED K, ESPOSITO S, AKRAM A, et al. Hot topics in diabetic foot infection [J]. Int J Antimicrob Agents,

- 2020,55(6):105942.
- [25] CHEN X, ALONZO F. Bacterial lipolysis of immune-activating ligands promotes evasion of innate defenses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(9): 3764-3773.
- [26] NGUYEN M T, LUQMAN A, BITSCHAR K, et al. Staphylococcal (phospho) lipases promote biofilm formation and host cell invasion [J]. Int J Med Microbiol, 2018, 308(6):653-663.
- [27] FADINI G P, MENEGAZZO L, RIGATO M, et al. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans[J]. Diabetes, 2016, 65(4):1061-1071.
- [28] CLAUDITZ A, RESCH A, WIELAND K P, et al. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress[J]. Infect Immun, 2006, 74(8): 4950-4953.
- [29] SELVARAJ A, VALLIAMMAI A, MUTHURAMALINGAM P, et al. Carvacrol targets SarA and CrtM of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to mitigate biofilm formation and staphyloxanthin synthesis: An *in vitro* and *in vivo* approach[J]. ACS Omega, 2020, 5(48):31100-31114.
- [30] NGUYEN H, NGUYEN T H, OTTO M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2020, 18: 3324-3334.
- [31] VALLE J, TOLEDO-ARANA A, BERASAIN C, et al. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus* [J]. Mol Microbiol, 2003, 48(4):1075-1087.
- [32] 周颖, 侯征, 薛小燕, 等. RNA III抑制肽对不同生长时相金黄色葡萄球菌毒力因子表达的影响[J]. 中国医药导报, 2020, 17(36):36-39, 44.
- [33] 童倩, 王毅, 周金鹤, 等. 亚抑菌浓度痰热清注射液抑制金黄色葡萄球菌 α -溶血素溶血活力[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9):86-93.
- [34] KURODA H, KURODA M, CUI L, et al. Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 268(1):98-105.
- [35] SHANG W, RAO Y, ZHENG Y, et al. β -lactam antibiotics enhance the pathogenicity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via sarA-controlled lipoprotein-like cluster expression [J]. mBio, 2019, 10(3):e00880-19.
- [36] JIN Y, GUO Y, ZHAN Q, et al. Subinhibitory concentrations of mupirocin stimulate *Staphylococcus aureus* biofilm formation by upregulating cidA [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(3): e01912-19.
- [37] BHATTACHARYA G, DEY D, DAS S, et al. Exposure to sub-inhibitory concentrations of gentamicin, ciprofloxacin and cefotaxime induces multidrug resistance and reactive oxygen species generation in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* [J]. J Med Microbiol, 2017, 66(6):762-769.
- [38] 李友山, 郑琪, 杨博华. 复方黄柏液涂剂治疗糖尿病足溃疡的多中心临床试验的疗效和安全性分析[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(20):2344-2348.
- [39] 朱艳. 复方黄柏液辅助抗菌药物对糖尿病患者足感染的疗效及其对创面及炎症因子水平改善的影响[J]. 抗感染药学, 2019, 16(10):1770-1773.
- [40] 王宁, 高岩, 连晓彤, 等. 复方黄柏液涂剂治疗糖尿病足溃疡感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的临床观察[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(19):2391-2394.
- [41] 王佳贺, 万小旭, 刘丹. 连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激的人单核巨噬细胞炎症反应的抑制作用[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(6):466-468.
- [42] 罗艺晨, 黄利明, 杨颖, 等. 绿原酸抑制金黄色葡萄球菌机理研究[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2016, 38(3):15-19.
- [43] 韩飞, 幸仁汇, 陈琳琦, 等. 中药抗细菌耐药性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5):813-817.
- [44] 程成, 张薇, 朱波, 等. 中药抗常见耐药菌的作用及其机制研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(2):229-233.

[责任编辑 周冰冰]