

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20246798

· 论 著 ·

抗寄生虫药物双氯酚对金黄色葡萄球菌的体外和体内抗菌活性研究

陈 体, 余鹏飞

(中南大学湘雅三医院检验科, 湖南 长沙 410013)

[摘要] **目的** 研究抗寄生虫药物双氯酚(DIC)对金黄色葡萄球菌的抗菌活性。**方法** 通过微量肉汤稀释试验和纸片扩散试验检测金黄色葡萄球菌对 DIC 的敏感性和耐药诱导能力, 时间-杀菌曲线检测 DIC 的杀菌效率, 结晶紫和 XTT 染色检测 DIC 对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用和对已形成生物膜的清除作用, Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒检测 DIC 的细胞毒性, 构建皮肤脓肿感染的小鼠模型检测 DIC 的体内抗菌活性和体内毒性。**结果** DIC 对金黄色葡萄球菌标准株的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)分别为 2~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 对金黄色葡萄球菌临床菌株的 MIC 和 MBC 分别为 2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。纸片扩散试验中, DIC 对金黄色葡萄球菌标准株具有明显的浓度依赖抑菌活性。时间-杀菌曲线显示, DIC 浓度为 4 \times MIC 时, 处理 2 h 金黄色葡萄球菌标准株 ATCC 29213 和处理 4 h 金黄色葡萄球菌 ATCC 43300 可分别将活菌浓度从(5.51 \pm 0.27) Log_{10} CFU/mL、(5.44 \pm 0.08) Log_{10} CFU/mL 降低至最低检测限。亚抑菌浓度的 DIC 连续作用于细菌传代 15 次后, 未见金黄色葡萄球菌耐药突变株形成。2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DIC 可显著抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成, 使其生物膜的总量从(100 \pm 7.49)%减少至(11.12 \pm 2.86)% ($P<0.001$); 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DIC 可显著清除已形成的金黄色葡萄球菌生物膜, 使生物膜的总量从(100 \pm 10.34)%减少至(42.53 \pm 16.87)% ($P<0.001$)。DIC 能显著降低小鼠脓肿组织中的金黄色葡萄球菌活菌载量, 使活菌数从(9.54 \pm 0.46) Log_{10} CFU/脓肿降低至(7.78 \pm 0.62) Log_{10} CFU/脓肿 ($P<0.05$)。苏木精-伊红染色结果显示, DIC 能明显缩小小鼠脓肿面积并降低组织中的炎性细胞浸润, 具有良好的体内耐受性。**结论** DIC 的细胞毒性小且体外和体内抗菌活性显著, 有望成为耐药金黄色葡萄球菌感染的替代治疗方案。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 双氯酚; 药物重新利用; 生物膜; 体内抗菌活性

[中图分类号] R446.5 R978.6

In vitro and *in vivo* antimicrobial activity of the antiparasitic drug dichlorophen against *Staphylococcus aureus*

CHEN Ti, SHE Peng-fei (Department of Laboratory Medicine, The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective** To explore the antimicrobial activity of antiparasitic drug dichlorophenol (DIC) against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). **Methods** Antimicrobial susceptibility and resistance inducing ability of *S. aureus* against DIC was detected by micro-broth dilution assay and disc diffusion test; bactericidal efficacy of DIC was assessed by time-killing curve; inhibitory effect of DIC on the formation of biofilm and eradicating of formed biofilm of *S. aureus* was detected by crystal violet and XTT staining; cytotoxicity of DIC was detected by cell counting kit-8 (CCK-8), and a mouse model of skin abscess infection was constructed to detect the *in vivo* antimicrobial activity and toxicity of DIC. **Results** The minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of DIC against *S. aureus* standard strains were 2-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The MIC and MBC of DIC against *S. aureus* clinical strains were 2-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 8-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Disc diffusion test indicated the

[收稿日期] 2024-07-23

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2024JJ5514, 2022JJ30882)

[作者简介] 陈体(1984-), 男(汉族), 湖南省长沙市人, 主管技师, 主要从事微生物耐药机制研究和新型抗菌药物研发。

[通信作者] 余鹏飞 E-mail: shepengfei_xy@csu.edu.cn

obvious concentration-dependent bacterial growth inhibitory effects of DIC on *S. aureus* standard strains. Time-killing assay revealed that DIC concentration of $4 \times \text{MIC}$ was found to reduce the viable bacterial cells of *S. aureus* standard strains ATCC 29213 and ATCC 43300 from $(5.51 \pm 0.27) \text{Log}_{10} \text{CFU/mL}$ and $(5.44 \pm 0.08) \text{Log}_{10} \text{CFU/mL}$ to the limit of detection after 2 hours and 4 hours treatment, respectively. No drug-resistant mutant strains of *S. aureus* were found after 15 consecutive passage of DIC with subinhibitory concentration on bacteria. $2 \mu\text{g/mL}$ DIC could significantly inhibit the formation of *S. aureus* biofilm and reduce the total amount of biofilm from $(100 \pm 7.49)\%$ to $(11.12 \pm 2.86)\%$ ($P < 0.001$). $2 \mu\text{g/mL}$ DIC significantly eradicated the formed *S. aureus* biofilm and reduced the total biofilm from $(100 \pm 10.34)\%$ to $(42.53 \pm 16.87)\%$ ($P < 0.001$). DIC could significantly reduce the viable bacterial load of *S. aureus* in abscess in mice, and reduce the number of viable bacteria from $(9.54 \pm 0.46) \text{Log}_{10} \text{CFU/abscess}$ to $(7.78 \pm 0.62) \text{Log}_{10} \text{CFU/abscess}$ ($P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining result showed that DIC could significantly reduce the abscess area and inflammatory cell infiltration in mice tissue, and was well tolerated *in vivo*.

Conclusion DIC has low cytotoxicity and obvious *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity, which is expected to be an alternative treatment for drug-resistant *S. aureus* infection.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; dichlorophenol; drug re-purposing; biofilm; *in vivo* antimicrobial activity

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是一种对甲氧西林和其他 β -内酰胺类抗生素具有耐药性的细菌^[1]。流行病学数据显示,MRSA 感染在医院和社区中均有发生,尤其在医院中,MRSA 可导致皮肤和软组织感染、肺部感染和血流感染等多种感染^[2]。MRSA 是皮肤和软组织感染的主要病原菌,可表现为轻微的皮肤损伤到严重的脓肿。皮下脓肿是 MRSA 感染的典型表现,通常需要手术引流和抗菌药物治疗^[3]。此外,MRSA 还能形成生物膜,极大地增加了细菌对抗菌药物的耐药性,使 MRSA 临床感染性疾病的治疗变得十分棘手^[4]。

近年来,重新利用美国食品药品监督管理局批准认证上市的非抗菌药物治疗金黄色葡萄球菌相关感染已成为一种有效的新兴策略(即“老药新用”)。如治疗糖尿病药物二甲双胍^[5]、非甾体类抗炎药^[6]、降压药苯磺噻嗪^[7]和抗抑郁药帕罗西汀^[8]等,已被重新评估对 MRSA 的体外和体内抗菌活性。此类药物重新利用为 MRSA 感染的治疗提供了新选择。前期通过高通量筛选试验发现双氯酚(dichlorophen, DIC)对金黄色葡萄球菌具有潜在的抗菌活性。DIC 也称 2,2'-亚甲基双(4-氯苯酚),其化学结构式由两个 4-氯苯酚桥接而成(见图 1)。DIC 是一种含氯的酚类化合物,被广泛用于治疗绦虫感染^[9]。DIC 对金黄色葡萄球菌的抗菌作用尚未见报道。

本研究采用微量肉汤稀释试验、纸片扩散试验、时间-杀菌曲线、生物膜抑制和清除试验,以及皮肤脓肿感染模型等方法,研究 DIC 体外、体内的抗菌活性和耐药诱导能力,及其对生物膜的抗菌活性和体内毒性。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 ELX800 全自动酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司,96 孔细胞培养板和 50 mL 离心管均购自美国康宁公司,Mueller-Hinton (MH) 平板和羊血琼脂平板购自郑州安图生物公司,全自动血球仪购自深圳迈瑞公司,全自动生化分析仪购自日本日立公司,胰大豆蛋白胨肉汤(tryptone soya broth, TSB)和 MH 肉汤购自上海索莱宝生物公司,DIC、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、结晶紫染料和 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒均购自美国 MedChemExpress 公司。吩嗪二甲酯硫酸盐和 2,3-双(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四唑-5-甲酰胺内盐(XTT)试剂均购自上海源叶生物公司,恒温摇床和恒温孵育箱购自美国赛默飞公司。本研究中 DIC 存储液溶解于 DMSO 中,制备浓度为 50 mg/mL 备用,所有试验的阴性对照组均使用含有最高测试药物浓度相同比例的 DMSO。

1.1.2 试验菌株与动物 金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC 43300、ATCC 25923、ATCC 29213、USA 300 和 MW2 均购自上海百纳生物菌种保存中心。金黄色葡萄球菌临床菌株均分离自中南大学湘雅三医院住院患者的痰标本,并由 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱双重鉴定。菌种接种于甘油磁珠中,置于 -80°C 冰箱保存,于血琼脂平板上传代 2 次后用于试验。金黄色葡萄球菌使用 TSB 进行培养。雌性无特殊病原菌级 ICR 小鼠购自湖南斯莱克景达实

验动物有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 微量肉汤稀释试验 将对数生长期的菌液制备成浓度 0.5 麦氏单位(McFarland, McF),相当于 1.5×10^8 CFU/mL,用 MH 肉汤稀释 200 倍后备用。用 MH 肉汤将 DIC 倍比稀释至 1、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{g/mL}$,每孔分别加 50 μL 至 96 孔细胞培养板中,再加入 50 μL 稀释好的菌液,使菌液终浓度约为 1×10^5 CFU/mL。将 96 孔细胞培养板放置湿盒,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~18 h 后读取最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),即孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度。从 $1 \times \text{MIC}$ 至最高浓度孔中分别吸取 5 μL 培养液至羊血琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,以杀灭培养基内所有细菌的最低抗菌药物浓度为最低杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC)^[10]。

1.2.2 纸片扩散试验 挑取金黄色葡萄球菌新鲜菌落于含有生理盐水的玻璃试管中,用麦氏比浊仪调至 0.5 McF。用无菌棉签蘸取菌悬液于 MH 平板上均匀涂布 3 次。将平板室温静置 10 min 后,每块平板分别贴上 5 块空白药敏纸片,再将 DIC 储存液点样到空白纸片上,使纸片的最终载药量分别为 0.05、0.1、0.2、0.4 mg。同时,将 DMSO 设置为阴性对照组。将平板室温静置 5 min 后,倒置放入恒温培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 16~18 h 后,观察纸片周围抑菌圈的大小^[10]。

1.2.3 时间-杀菌曲线 挑取金黄色葡萄球菌新鲜菌落于 TSB 中,并用麦氏比浊仪调至 0.5 McF,稀释 100 倍至 1.5×10^6 CFU/mL 备用。向 50 mL 离心管中,每管加入 20 mL 备用菌悬液,再分别加入 DIC 储存液至终浓度为 $1/4 \times \text{MIC}$ 、 $1/2 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 和 $4 \times \text{MIC}$ 。同时,将 DMSO 设置为阴性对照组。将离心管放置恒温摇床中,37 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 摇菌培养,并分别于 0、2、4、8、12、24 h 转移菌悬液进行平板稀释菌落计数,绘制时间-杀菌曲线^[11]。

1.2.4 结晶紫(crystal violet, CV)和 XTT 染色检测生物膜 生物膜抑制试验:挑取金黄色葡萄球菌菌落于 TSB 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 摇菌培养 24 h,用新鲜 TSB 1:200 稀释菌悬液备用;使用 TSB 将 DIC 储存液倍比稀释至 4、8、16、32、64 $\mu\text{g/mL}$,向 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μL 。将 DMSO 设置为阴性对照组,再向每孔分别加入 100 μL 备用菌悬液。将 96 孔细胞培养板放置湿盒中,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 24 h 后,用 PBS 漂洗 96 孔细胞培养板 3 次后进行如

下试验。①CV 染色:每孔分别加入 200 μL 0.25% (wt/vol)的 CV 染液。室温静置孵育 15 min 后,弃 CV,用 PBS 漂洗 3 次,每孔加入 200 μL 95% 乙醇。室温静置孵育 20 min 后,用酶标仪检测 570 nm 处的吸光度(Absorbance, A),即为生物膜的相对总量($A_{570\text{nm}}$)。②XTT 染色:每孔分别加入 100 μL 的吩嗪二甲酯硫酸盐(0.02 mg/mL)、100 μL 的 XTT (0.2 mg/mL),放置恒温孵育箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h 后检测 490 nm 处的吸光度,即为生物膜的相对活性($A_{490\text{nm}}$)。

生物膜清除试验:将金黄色葡萄球菌摇菌培养 24 h 后,使用新鲜 TSB 培养基 1:200 稀释,向 96 孔细胞培养板中每孔加入 200 μL 菌悬液。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置孵育 24 h 后,使用 PBS 漂洗 96 孔细胞培养板 3 次去除未与孔板黏附的细菌。每孔加入 200 μL 倍比稀释的 DIC(浓度分别为 2、4、8、16、32 $\mu\text{g/mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 24 h 后,使用 PBS 漂洗 96 孔细胞培养板 3 次后分别进行 CV、XTT 染色,其余同上^[12]。

1.2.5 CCK-8 试剂盒检测细胞毒性 使用达尔伯克改良伊格尔高糖培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) + 10% 胎牛血清 + 1% 青霉素和链霉素,在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下体外培养 Th22 细胞。待细胞汇合度达到 80% 后,使用胰蛋白酶消化贴壁细胞,待细胞消化完成后用 DEME 培养基终止消化,2 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,再使用 DMEM 培养基重悬细胞沉淀,并进行细胞计数。以每孔 10 000 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 50 μL 。再分别加入倍比稀释的 DIC,使其终浓度分别为 1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g/mL}$,将 DMSO 设置为阴性对照组。将 96 孔细胞培养板置于 CO_2 温箱孵育 24 h。每孔再分别加入 CCK-8 溶液 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 1.5 h,使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的吸光度($A_{450\text{nm}}$)^[13]。

1.2.6 皮肤脓肿感染模型及急性体内毒理评估 动物试验由中南大学实验动物福利伦理委员会批准。将清洁级 6~8 周龄 ICR 雌性小鼠(体重约 25 g)随机分成 DIC 组和对照组,每组 6 只小鼠。观察小鼠的精神状态、生理状态、饮水和饮食情况,适应 7 d 后背部皮肤去毛备用。离心收集对数生长期金黄色葡萄球菌 ATCC 43300,使用生理盐水调成浓度为 3 McF,每只小鼠背部皮下注射 200 μL 3 McF 的菌液。感染 30 min 后,试验组按照 30 mg/kg 的治疗剂量皮下注射 DIC,对照组仅注射 DMSO 溶剂,观察小鼠的精神状态、生理状态、饮水和饮食情况有

无变化。感染 24 h 后采集小鼠血液,检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(urea)、肌酐(CRE)、尿酸(UA)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、血小板计数(PLT)等生物学指标。同时,每组留取一只小鼠的脓肿、心脏、肝脏和肾脏组织进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。每组剩下 5 只小鼠的脓肿组织剪碎,添加 1 mL 生理盐水,超声破碎处理后进行细菌计数^[14]。

1.2.7 统计学分析 所有数据通过 GraphPad Prism 8.0 软件处理。计量资料符合正态分布,采用均值±标准差表示,独立样本的两组间比较采用 Student's *t* 检验,多组样本间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DIC 对金黄色葡萄球菌抗菌的活性 DIC 对 5 株金黄色葡萄球菌标准株的 MIC 和 MBC 分别为 2~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,见表 1。DIC 对 6 株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)和 6 株 MRSA 临床菌株具有相似的抗菌活性,其 MIC 和 MBC 分别为 2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$,见表 2。

表 1 DIC 对金黄色葡萄球菌标准菌株的药敏结果

Table 1 Antimicrobial susceptibility of DIC against *S. aureus* standard strains

标准株	菌株类型	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MBC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
ATCC 43300	MRSA	4	4
USA 300	MRSA	2	2
MW2	MSSA	4	8
ATCC 25923	MSSA	4	4
ATCC 29213	MSSA	4	4

纸片扩散试验中,DIC 对金黄色葡萄球菌标准株 ATCC 29213 和 ATCC 43300 具有明显的抑菌活性,其抑菌圈随着 DIC 浓度的增加而扩大,见图 1。时间-杀菌曲线显示,DIC 的抗菌活性具有浓度依赖性,且当 DIC 浓度 $\geq 1 \times \text{MIC}$ 时,可表现出明显的杀菌作用;当 DIC 浓度为 $4 \times \text{MIC}$ 时,处理 2 h 可将金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 活菌浓度从

表 2 DIC 对金黄色葡萄球菌临床菌株的药敏结果

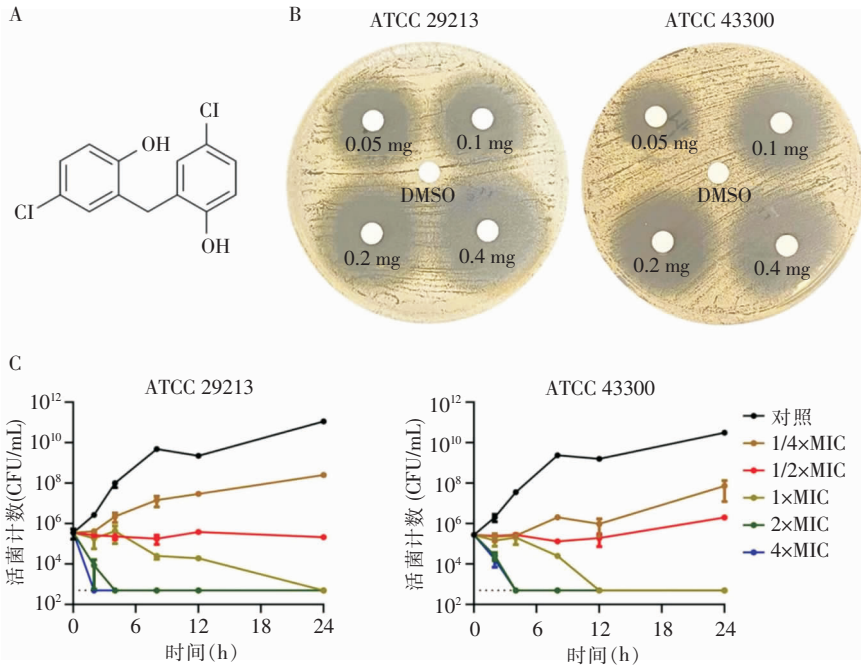
Table 2 Antimicrobial susceptibility of DIC against *S. aureus* clinical strains

临床菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MBC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
MSSA1	4	8
MSSA2	4	16
MSSA3	4	16
MSSA4	8	32
MSSA5	4	32
MSSA6	8	32
MRSA1	4	8
MRSA2	4	16
MRSA3	2	16
MRSA4	2	16
MRSA5	8	8
MRSA6	2	32

(5.51 ± 0.27) Log_{10} CFU/mL 降至最低检测限,处理 4 h 可将金黄色葡萄球菌 ATCC 43300 的活菌浓度从 (5.44 ± 0.08) Log_{10} CFU/mL 降至最低检测限,见图 1。

2.2 DIC 对金黄色葡萄球菌的耐药诱导作用 环丙沙星(CIP)能有效诱导金黄色葡萄球菌耐药突变的形成, $1/2 \times \text{MIC}$ 亚抑菌浓度的 CIP(MIC 均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)连续作用于细菌传代 15 次后,可使金黄色葡萄球菌标准株 ATCC 29213 和 ATCC 43300 的 MIC 分别上升 16、8 倍;而 $1/2 \times \text{MIC}$ 浓度的 DIC 作用于细菌传代 15 次后未见耐药突变的形成,其 MIC 值均同原代。见图 2。

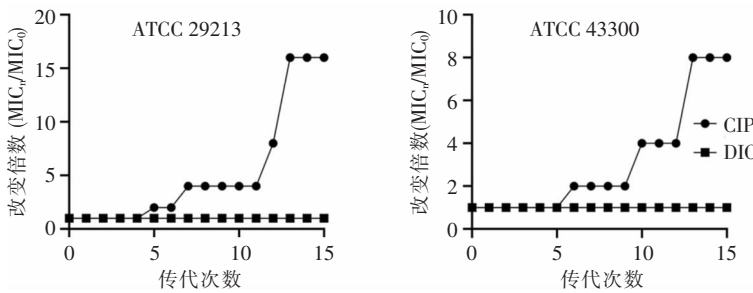
2.3 DIC 抗生物膜作用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DIC 使金黄色葡萄球菌生物膜的总量从 (100 ± 7.49)% 减少至 (11.12 ± 2.86)% ($q = 28.78, P < 0.001$),且使金黄色葡萄球菌生物膜内活菌量从 (100 ± 3.44)% 降低至 (3.18 ± 0.42)% ($q = 79.90, P < 0.001$),可显著抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成,见图 3A。2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DIC 使金黄色葡萄球菌生物膜的总量从 (100 ± 10.34)% 减少至 (42.53 ± 16.87)% ($q = 6.12, P < 0.001$),且使金黄色葡萄球菌生物膜内活菌量从 (100 ± 34.94)% 降低至 (45.59 ± 25.13)% ($q = 3.77, P < 0.05$),能显著清除已形成的生物膜,且随着 DIC 浓度升高,其对生物膜的清除能力越强,见图 3B。



注:A为DIC化学结构式;B为纸片扩散试验检测DIC的抑菌活性;C为时间-杀菌曲线检测DIC的杀菌活性。

图1 不同浓度的DIC对金黄色葡萄球菌标准菌株的抗菌活性及时间-杀菌曲线

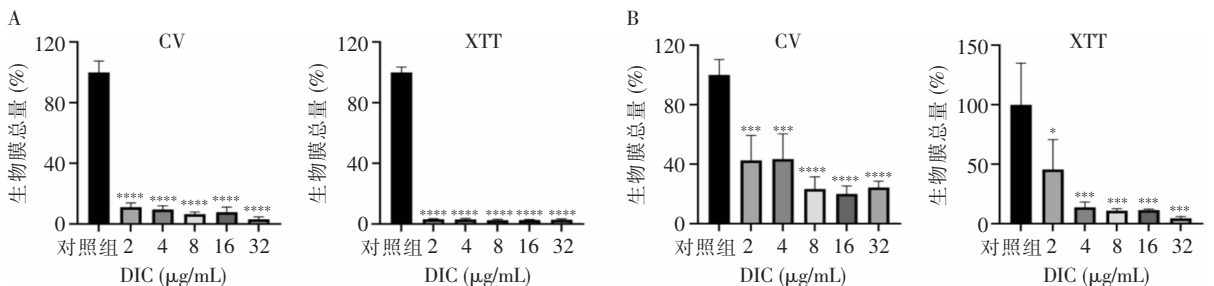
Figure 1 Antimicrobial susceptibility and time-killing curves of DIC with different concentrations against *S. aureus* standard strains



注:CIP为阳性对照组。

图2 DIC对金黄色葡萄球菌标准株ATCC 29213和ATCC 43300的耐药诱导结果

Figure 2 Resistance inducing results of DIC against *S. aureus* standard strains ATCC 29213 and ATCC 43300



注:A为DIC有效抑制金黄色葡萄球菌标准株ATCC 43300生物膜的形成;B为DIC有效清除金黄色葡萄球菌标准株ATCC 43300已形成的生物膜。*表示与对照组比较 $P < 0.05$; **表示与对照组比较 $P < 0.01$; ***表示与对照组比较 $P < 0.001$; ****表示与对照组比较 $P < 0.0001$ 。

图3 DIC抗金黄色葡萄球菌生物膜的作用

Figure 3 Antibiofilm effect of DIC against *S. aureus* standard strains

2.4 DIC 的细胞毒性 CCK-8 细胞毒性试验中, DIC 对人 T 辅助细胞 Th22 的半数抑制浓度为 29.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 见图 4。

2.5 DIC 治疗小鼠金黄色葡萄球菌皮肤脓肿效果 DIC 能明显促进小鼠金黄色葡萄球菌皮肤脓肿的愈合, 缩小脓肿面积, 见图 5A。倍比稀释菌落计数显示, 与对照组相比, DIC 组能显著降低小鼠脓肿组织中的活菌载量, 见图 5B; 且使活菌数从 $(9.54 \pm 0.46) \text{Log}_{10} \text{CFU}/\text{脓肿}$ 降低至 $(7.78 \pm 0.62) \text{Log}_{10} \text{CFU}/\text{脓肿}$ ($t = 2.35, P < 0.05$), 见图 5C。HE 染色结果显示 DIC 能明显缩小小鼠脓肿面积并降低组织中的炎性细胞浸润, 见图 5D。

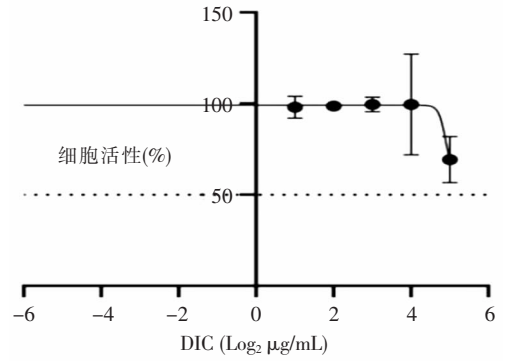
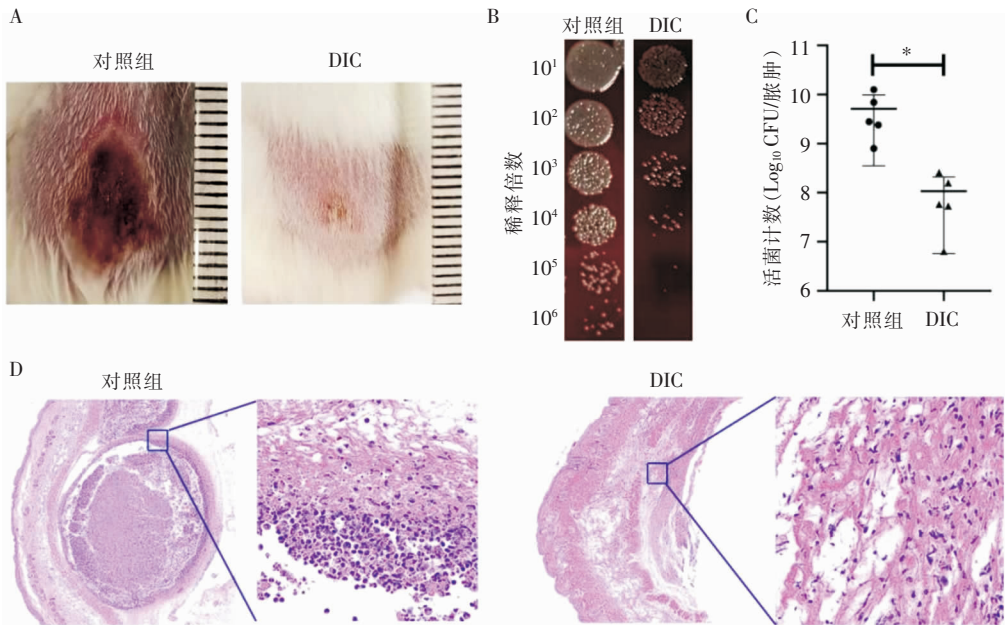


图 4 抗菌浓度的 DIC 细胞毒性作用

Figure 4 Cytotoxic effect of DIC with antimicrobial concentration



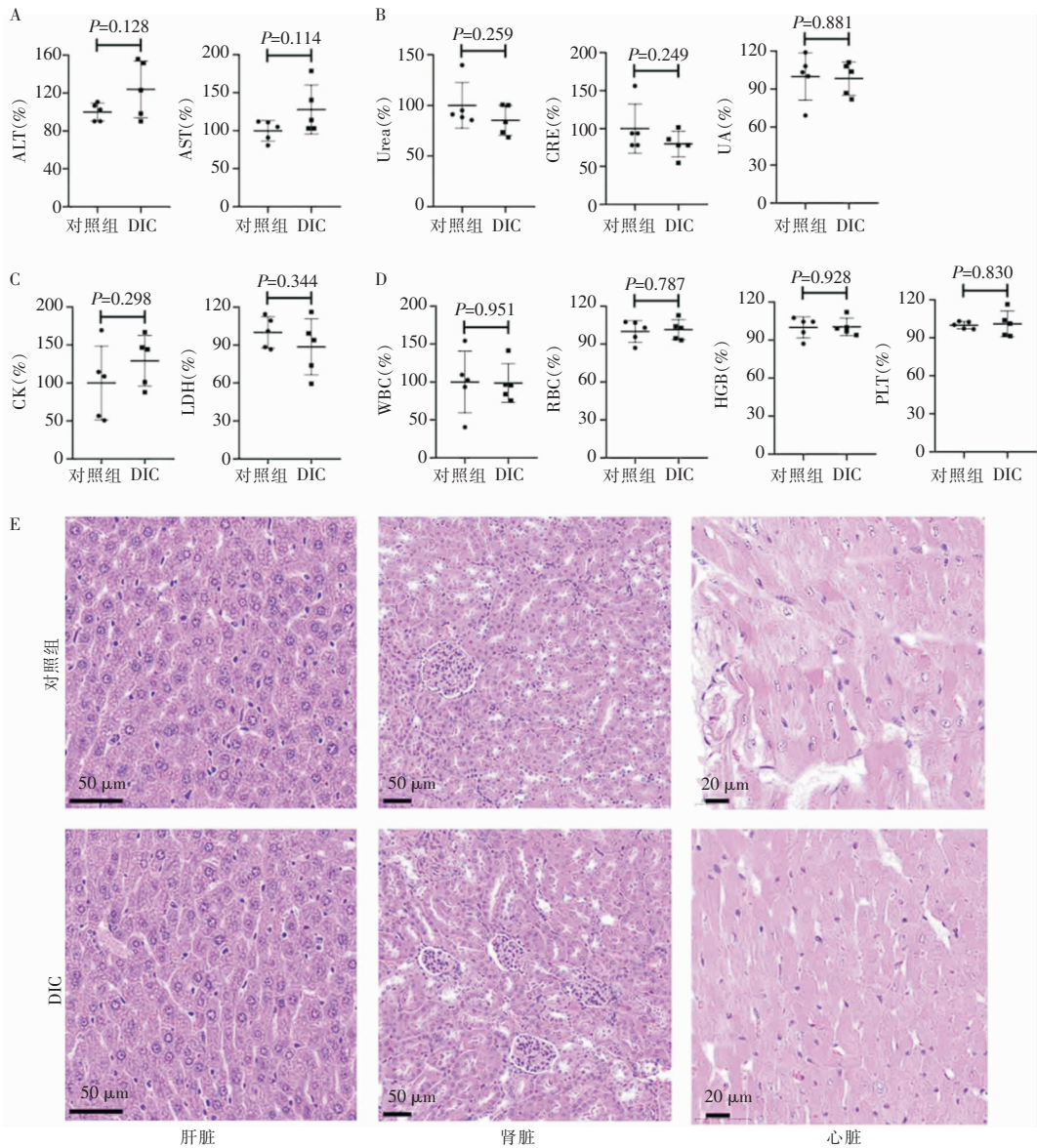
注: A 为对照组和 DIC 组皮肤脓肿图片; B 为平板稀释菌落计数对照组和 DIC 组中活菌数量; C 为 DIC 组显著降低小鼠脓肿组织中活菌计数; D 为 DIC 有效降低小鼠脓肿组织中的炎性细胞浸润。* 表示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 DIC 治疗小鼠金黄色葡萄球菌皮肤脓肿感染的效果

Figure 5 Effect of DIC on treating *S. aureus* skin abscess infection in mice

2.6 DIC 体内耐受性 与对照组比较, DIC 组小鼠肝功能指标 (ALT 和 AST)、肾脏功能指标 (Urea、CRE 和 UA)、心肌功能指标 (CK 和 LDH) 和血常规相关参数 (WBC、HGB 和 PLT) 比较, 差异均无统

计学意义 (均 $P > 0.05$)。DIC 组的肝脏、肾脏和心肌组织与对照组 HE 染色比较, 无明显病理学改变。见图 6。



注:A为肝脏功能标志物;B为肾脏功能标志物;C为心脏功能标志物;D为血常规相关参数分析;E为HE染色检测肝脏、肾脏和心肌组织的病理改变。

图6 治疗剂量的DIC体内毒性情况

Figure 6 *In vivo* toxicity of DIC at therapeutic doses

3 讨论

随着抗菌药物不合理使用,金黄色葡萄球菌的耐药性已成为全球难题,针对金黄色葡萄球菌的新型抗菌药物研究已成为热点。本研究发现抗寄生虫药物DIC对金黄色葡萄球菌具有良好的体外和体内抗菌活性,且不易诱导耐药突变的形成。此外,DIC还能有效抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成并能有效清除已形成的生物膜。DIC虽然具有极小的细胞毒性,但其体内耐受性佳,成药潜力大。

药物重新利用已成为新型抗菌药物研发的高效手段。Lajarin-Reinares等^[15]发现治疗慢性酒精中毒的小分子药物二硫仑通过螯合金属离子对金黄色葡萄球菌和产脓链球菌呈现体外和体内抗菌活性;抗寄生虫药物氯硝柳胺也被报道对金黄色葡萄球菌在内的多种革兰阳性菌具有良好的体外和体内抗菌活性,且亚抑菌浓度的氯硝柳胺还能抑制金黄色葡萄球菌 α -溶血素的分泌^[16]。与这些研究不同的是,DIC作为一种抗寄生虫药物,既能发挥有效的抗菌作用,还能抑制炎症反应的发生和发展,其双重作用效果将为感染性疾病带来协同治疗效果。

本研究时间-杀菌曲线显示, DIC 对细菌具有快速的杀菌活性, 其 MIC 和 MBC 均较低, 提示 DIC 可能是一种具有溶菌活性的化合物, 此类化合物往往能通过作用于细菌细胞膜而发挥快速杀菌作用。因此, 推测 DIC 可能特异性靶向金黄色葡萄球菌的细胞膜, 导致细胞膜穿孔细胞裂解死亡。近年来, 许多药物重新利用的相关研究也报道了小分子化合物对细菌细胞膜的靶向作用, 如 Kim 等^[17]发现抗肿瘤药物 CD437 可通过破坏金黄色葡萄球菌细胞膜而发挥快速的杀菌活性; Dayal 等^[18]发现靶向细菌细胞膜的小分子 bithionol 能起到快速杀菌作用, 还能有效清除 MRSA 已形成的生物膜。

生物膜内部的细菌耐药性极高, 传统抗菌药物难以根治已形成的生物膜。本研究结果显示, 亚抑菌浓度的 DIC 也表现出极强的抗金黄色葡萄球菌生物膜活性。2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/2 \times MIC) 的 DIC 几乎能完全抑制金黄色葡萄球菌标准株 ATCC 43300 生物膜的形成, 还能有效清除金黄色葡萄球菌已形成的生物膜。Jiang 等^[19]2023 年报道, 通过高通量虚拟筛选发现非甾体类抗炎药物非诺洛芬能特异性靶向金黄色葡萄球菌双组份系统 SaeRS 中的 SaeR 蛋白, 从而抑制其毒力因子的分泌和生物膜的形成; 由于 DIC 与非诺洛芬的母核结构相似, 因此推测 DIC 可能通过靶向 SaeRS 双组份系统而发挥对金黄色葡萄球菌生物膜的抗菌活性。诸多文献报道了吡罗昔康、双氯芬酸钠、乙酰水杨酸和萘普生钠等类似母核结构对金黄色葡萄球菌, 甚至大肠埃希菌的生物膜抗菌活性, 但上述小分子药物对细菌本身无杀菌作用或杀菌作用极弱, 仅通过调控生物膜形成周期而发挥抗生物膜作用^[20]。DIC 既能有效杀灭细菌, 还能有效对抗细菌生物膜, 其成药潜力更高。

本研究发现 DIC 对人体细胞株的毒性小。皮肤软组织感染是金黄色葡萄球菌相关感染的主要类型, 而局部给药方式可以有效避免 DIC 在血液中的聚集, 从而降低其细胞毒性。近年来, 随着药物重新利用的研究热潮, 尽管美国食品药品监督管理局认证的一些小分子药物作为抗菌药物使用时, 在其有效浓度下, 细胞毒性稍偏大, 但因其具有良好的抗生物膜作用和滞留菌抗菌效果, 或对高耐药的金黄色葡萄球菌具有抗菌活性等特点而仍具临床价值。Liu 等^[21]发现酪氨酸激酶抑制剂类抗肿瘤药物色瑞替尼虽然对人体来源细胞株毒性较大, 但其能通过破坏细菌细胞膜而发挥对金黄色葡萄球菌生物膜和滞留菌的杀菌作用, 且不易诱导耐药突变。本研究

小鼠体内模型皮下单次注射治疗剂量 30 mg/kg 的 DIC, 未检测到明显的体内毒性。

DIC 是一种美国食品药品监督管理局认证的抗寄生虫药物, 本研究发现其对金黄色葡萄球菌及其生物膜有显著的抗菌效果且不易诱导耐药的形成。DIC 合成路线成熟, 药物不良反应明确, 有望成为临床中难治性金黄色葡萄球菌及其生物膜相关感染的替代药物。然而, 本研究尚缺乏对 DIC 作用机制方面的探讨, 后续研究还应注重阐明 DIC 的作用靶点, 采用生物信息学或生物物理学手段对靶点结构进行优化, 以及通过纳米递药和抗菌药物联合使用等手段, 进一步增强 DIC 的抗菌效果, 降低其细胞毒性, 改善其药代动力学表现, 使其适用于金黄色葡萄球菌相关感染的治疗, 从而增强其临床适用性。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Kaushik A, Kest H, Sood M, et al. Biofilm producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in humans; clinical implications and management[J]. Pathogens, 2024, 13(1): 76.
- [2] Leme RCP, Bispo PJM, Salles MJ. Community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Latin America; a systematic review[J]. Braz J Infect Dis, 2021, 25(1): 101539.
- [3] Hindy JR, Haddad SF, Kanj SS. New drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections [J]. Curr Opin Infect Dis, 2022, 35(2): 112 - 119.
- [4] Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. Virulence, 2021, 12(1): 547 - 569.
- [5] Hossain S, Rafi RH, Ripa FA, et al. Modulating the antibacterial effect of the existing antibiotics along with repurposing drug metformin[J]. Arch Microbiol, 2024, 206(4): 190.
- [6] Bakht P, Ijaz M, Iqbal MZ, et al. Repurposing of non-steroidal anti-inflammatory drugs for combination therapies to combat multidrug-resistant *S. aureus* of bovine reproductive tract origin[J]. Vet Res Commun, 2024, 48(3): 1497 - 1510.
- [7] Stefany Aires do Nascimento FB, do Amaral Valente Sá LG, de Andrade Neto JB, et al. Antimicrobial activity of hydralazine against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* [J]. Future Microbiol, 2024, 19: 91 - 106.
- [8] Cabral VP, Rodrigues DS, Barbosa AD, et al. Antibacterial activity of paroxetine against *Staphylococcus aureus* and possible mechanisms of action[J]. Future Microbiol, 2023, 18: 415 - 426.

- [9] Khaw TH, Wong SNM, Herle G, et al. Identification of bithionol, dichlorophen, and miconazole as antibacterial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. ACS Omega, 2020, 5(37): 23951–23959.
- [10] Pengfei S, Yaqian L, Lanlan X, et al. L007-0069 kills *Staphylococcus aureus* in high resistant phenotypes[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(11): 552.
- [11] Song MR, Liu Y, Li TT, et al. Plant natural flavonoids against multidrug resistant pathogens[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(15): e2100749.
- [12] Xu LL, She PF, Chen LH, et al. Repurposing candesartan cilexetil as antibacterial agent for MRSA infection[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 688772.
- [13] Wei SK, Xu PC, Yao ZX, et al. A composite hydrogel with co-delivery of antimicrobial peptides and platelet-rich plasma to enhance healing of infected wounds in diabetes[J]. Acta Biomater, 2021, 124: 205–218.
- [14] 陈体, 段瑶, 张晓洁, 等. 匹莫齐特对金黄色葡萄球菌的体外和体内抗菌研究[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(12): 1475–1482.
- Chen T, Duan Y, Zhang XJ, et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of pimozide against *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2023, 22(12): 1475–1482.
- [15] Lajarin-Reinares M, Pena-Rodriguez E, Cañellas-Santos M, et al. Repurposing disulfiram as an antimicrobial agent in topical infections[J]. Antibiotics (Basel), 2022, 11(12): 1752.
- [16] Zhang W, Ran JX, Shang L, et al. Niclosamide as a repurposing drug against Gram-positive bacterial infections[J]. J Antimicrob Chemother, 2022, 77(12): 3312–3320.
- [17] Kim W, Zhu WP, Hendricks GL, et al. A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters [J]. Nature, 2018, 556(7699): 103–107.
- [18] Dayal N, Onyedibe KI, Gribble WM, et al. Membrane acting Povarov-Doebner derived compounds potently disperse preformed multidrug resistant Gram-positive bacterial biofilms [J]. Eur J Med Chem, 2022, 240: 114550.
- [19] Jiang F, Chen YJ, Yu JL, et al. Repurposed fenoprofen targeting SaeR attenuates *Staphylococcus aureus* virulence in implant-associated infections[J]. ACS Cent Sci, 2023, 9(7): 1354–1373.
- [20] Leão C, Borges A, Simões M. NSAIDs as a drug repurposing strategy for biofilm control[J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9(9): 591.
- [21] Liu SS, She PF, Li ZH, et al. Insights into the antimicrobial effects of ceritinib against *Staphylococcus aureus in vitro* and *in vivo* by cell membrane disruption[J]. AMB Express, 2022, 12(1): 150.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:陈体,余鹏飞.抗寄生虫药物双氯酚对金黄色葡萄球菌的体外和体内抗菌活性研究[J].中国感染控制杂志,2024,23(12):1477–1485. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20246798.

Cite this article as: CHEN Ti, SHE Peng-fei. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of the antiparasitic drug dichlorophen against *Staphylococcus aureus*[J]. Chin J Infect Control, 2024, 23(12): 1477–1485. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20246798.