



研究报告

大黄酸抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌机制

覃静¹ 祖敬芝² 罗沙¹ 彭静¹ 任瑶瑶^{*1} 谭睿^{*1}

1 西南交通大学生命科学与工程学院 四川 成都 610000

2 西南交通大学医学院 四川 成都 610000

摘要:【背景】耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是医院及社区常见的机会性致病菌,具有多重耐药性、高发病率和高死亡率的特点。MRSA感染已成为全球医学界的普遍难题之一。【目的】研究大黄酸对MRSA的抗菌机制。【方法】以二倍稀释法测定大黄酸对MRSA的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC);通过MIC测定大黄酸对MRSA动态抑菌作用;建立生物膜模型,测定大黄酸在生物膜屏障下对生物膜内存活菌的影响,并通过扫描电镜观察不同浓度大黄酸作用后的MRSA菌体形态变化;用免疫荧光染色法、荧光分析法测定大黄酸对MRSA细胞质膜去极化和细胞膜通透性的影响。【结果】大黄酸对MRSA的MIC为8 μg/mL;大黄酸能对生物膜内存活菌有明显的抑制作用,而且在大黄酸作用下菌体的形态发生明显皱缩和破损,破损严重程度与浓度呈正相关;随着大黄酸浓度和作用时间的增加,荧光强度出现明显变化,细胞膜的通透性发生改变。【结论】大黄酸主要通过损伤细菌的细胞膜,从而抑制细菌的生长和繁殖。

关键词: 大黄酸, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 抗菌机制

Antibacterial mechanism of rhein against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

QIN Jing¹ ZU Jingzhi² LUO Sha¹ PENG Jing¹ REN Yaoyao^{*1} TAN Rui^{*1}

1 School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610000, China

2 School of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610000, China

Abstract: [Background] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a common opportunistic pathogen in hospitals and the community, characterized by multi-drug resistance, high morbidity and mortality, and MRSA infection has become one of the common problems in the global medical community. [Objective] To study the antibacterial mechanism of rhubarb acid against MRSA. [Methods] To determine

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1706200); Key Research and Development Program of Sichuan Province (20ZDYF3291); Key Project of Sichuan Provincial Traditional Chinese Medicine Administration (2018C031); Fundamental Research Funds for the Central Universities (A0920502052001-8)

***Corresponding authors:** E-mail: REN Yaoyao: yyren82@163.com; TAN Rui: tanrui@swjtu.edu.cn

Received: 02-09-2020; **Accepted:** 23-10-2020; **Published online:** 25-11-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1706200); 四川省重点研发项目(20ZDYF3291); 四川省中医药管理局重点项目(2018C031); 中央高校基本科研业务费专项基金(A0920502052001-8)

***通信作者:** E-mail: 任瑶瑶: yyren82@163.com; 谭睿: tanrui@swjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-09-02; **接受日期:** 2020-10-23; **网络首发日期:** 2020-11-25

the minimum inhibitory concentration (MIC) of rhubarb acid on MRSA by two-fold dilution method; to determine the dynamic inhibitory effect of rhubarb acid on MRSA by MIC; to establish a biofilm model and determine the effect of rhubarb acid on viable bacteria in biofilm barrier, and to observe the effect of rhubarb acid by scanning electron microscope. The morphological changes of MRSA bacteria after the action of different concentrations of rhubarb acid; the effects of rhubarb acid on the depolarization and permeability of MRSA cell plasma membrane were determined by immunofluorescence staining and fluorescence analysis. **[Results]** The MIC of rhein on MRSA was 8 $\mu\text{g/mL}$; rhein had obvious inhibitory effect on the surviving bacteria in the biofilm, and under the effect of rhein, the morphology of the bacterial body was obviously wrinkled and damaged, and the severity of damage was positively correlated with the concentration; with the increase of rhein concentration and effect time, the fluorescence intensity changed obviously, and the permeability of the cell membrane changed. **[Conclusion]** Rhein mainly damaged the cell membrane of bacteria, thus inhibiting the growth and reproduction of bacteria.

Keywords: rhein, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, antibacterial mechanism

金黄色葡萄球菌是一种在自然界广泛分布的细菌,多存在于人体的皮肤,尤其是鼻咽部^[1]。金黄色葡萄球菌感染会引起皮肤及软组织的化脓现象,还可引起恶心、呕吐、腹部痉挛等症状^[2],当宿主出现免疫功能低下的情况时,金黄色葡萄球菌能够入侵机体引起呼吸道等疾病的发生,严重者可能会出现败血症^[3]。自1961年临床报告首例耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)感染患者以来,MRSA感染的患者急剧增多且遍布全球^[4],感染后因其具有多重耐药且耐药性快速变化的特点,使得MRSA已成为目前医院感染的主要病原菌之一^[5-6],并成为临床治疗的重要难题。在1980年以后成为全球性的病原微生物,引起了世界范围内的关注^[7]。中药是中国传统医学的重要组成部分,随着循证医学的发展,中药的疗效研究得到了快速发展,尤其是中药在抗菌方面发挥的作用^[8]。大黄酸(Rhein, 4,5-Dihydroxy Anthraquinone)属单蒽核类1,8-二羟基蒽醌衍生物^[9],其具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、利尿和泻下等多种生物活性^[10],具有很大的潜在临床药用价值,成为研究的热点。大黄酸在抗MRSA方面表现突出,但目前关于大黄酸对MRSA的抑菌作用机制研究缺乏系统性,因此,本实验对此进行研究,以期开发新的抗MRSA感染中药奠定理论基础与科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),由西南交通大学微生物实验室提供。大黄酸,四川维克奇生物科技有限公司;MH琼脂培养基、MH肉汤培养基,青岛海博生物技术有限公司;PI染液,江苏凯基生物技术有限公司;DAPI染液、0.1%结晶紫溶液,北京索莱宝科技有限公司;DISC3(5)荧光染料,ATT Bioquest公司;考马斯亮蓝快速染液,上海雅酶生物科技有限公司。多功能酶标仪, Molecular Devices公司;激光共聚焦显微镜,尼康公司;场发射扫描电子显微镜,电子株式会社;低温超速离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的活化和菌液的制备

将保存的MRSA菌株接种于MH肉汤培养基中,于恒温空气浴振荡培养箱中以37℃、200 r/min振荡培养12 h;将上述菌液在MH琼脂培养基上划线,于恒温培养箱中37℃培养24 h;挑单克隆菌落于MH肉汤培养基中,以37℃、200 r/min振荡培养8 h,至此为完成菌种的一轮活化。完成2轮活化后的菌液,以8 000 r/min离心5 min,弃掉上清,再用灭菌的MH肉汤培养基稀释菌体沉淀至 10^6 CFU/mL,作为实验菌液。

1.2.2 最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

用 0.1%碳酸氢钠溶解大黄酸,并用灭菌 MH 肉汤培养基将其稀释成 0.32 mg/mL,采用二倍稀释法测定最小抑菌浓度:在最高浓度孔加入菌液(10^6 CFU/mL) 180 μ L 和 20 μ L 大黄酸溶液,其余孔加入 100 μ L 菌液(10^6 CFU/mL)进行梯度稀释,使其浓度分别为 256.0、128.0、64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0 和 0.5 μ g/mL,每个浓度设置 3 个复孔,并设置阳性对照孔和阴性对照孔,稀释后将 96 孔板放置在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h,观察结果,实验重复 3 次。阴性对照孔显示清亮,阳性对照孔显示浑浊,以肉眼观察孔内溶液澄清的最低浓度即为化合物的 MIC 值。

1.2.3 大黄酸对 MRSA 的动态抑菌曲线

吸取不同体积的大黄酸溶液于 10^6 CFU/mL 的 MRSA 菌悬液中,使菌液中药物的终浓度为 $1\times$ MIC、 $2\times$ MIC 和 $3\times$ MIC,不加药为对照组,分别在培养后的 0、1、2、4、8、12、16 和 24 h 取样测定各组的细菌量,取样后用 MH 肉汤培养基对菌液进行梯度稀释,稀释倍数分别为 10^4 、 10^5 和 10^6 倍,每个浓度取 5 μ L 分 3 次滴加在 MH 琼脂培养基上,在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养过夜,记菌落数,将各组最高可读倍数下菌落数(3 个稀释倍数下菌落数的平均值)换算成 CFU/mL,实验重复 3 次。以培养时间为横坐标,以细菌数量的对数值为纵坐标,应用 Excel 2019 软件进行统计分析,使用 GraphPad Prism 8 绘制抑菌曲线,分析大黄酸溶液的动态抑菌效果。

1.2.4 大黄酸对 MRSA 凋亡坏死的影响

4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI)是一种能够与 DNA 中大部分 A 和 T 碱基相互结合的荧光染料,可以透过完整的细胞膜,发射光为蓝色;碘化丙啶(PI)不能透过完整的细胞膜,当细胞凋亡或坏死的时候,其可以透过细胞质膜而使细胞核染红,释放出现红色荧光。取 MRSA 菌悬液(10^6 CFU/mL),加入大黄酸溶液,使其终浓度为

$2\times$ MIC,不加药作为对照组。在 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养箱中培养,2 组分别在 0、4、8 和 12 h 取样,4 000 r/min 离心 5 min 后,用 MH 肉汤培养基重悬细菌。在避光条件下,向菌液中加入 DAPI 和 PI 染液,冰上避光孵育 15 min。在避光条件下进行样品封片,于激光共聚焦显微镜下拍照,实验重复 3 次。应用 NIS-Elements Viewer 4.20 和 Image J 进行统计分析,使用 GraphPad Prism 8 作图。

1.2.5 大黄酸对生物膜内存活菌的影响

通过建立 MRSA 生物膜模型,观察不同浓度的大黄酸在生物膜屏障下对细菌的杀伤作用。取 MRSA 菌悬液(10^6 CFU/mL),以每孔 200 μ L 加入到 96 孔细胞培养板中,在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 24 h,用无菌 PBS 溶液洗涤,得到 MRSA 生物膜模型。加入含不同浓度大黄酸的 MH 肉汤培养基为实验组,不加药为对照组,放置 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 12 h。弃去孔内培养物,用无菌 PBS 缓冲液洗涤后重悬,40 KHz 超声器超声 10 min,超声结束后吸取溶液至新的 96 孔板中,用 MH 肉汤培养基进行稀释,稀释倍数分别为 10^4 、 10^5 和 10^6 倍,每个浓度取 5 μ L 分 3 次滴加在 MH 琼脂培养基上,在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 24 h,记菌落数,将各组最高可读倍数下菌落数(3 个稀释倍数下菌落数的平均值)换算成 CFU/mL,实验重复 3 次,以培养时间为横坐标,以细菌数量的对数值为纵坐标,绘制生物膜内细菌存活数量图。为便于观察实验结果,用 PBS 缓冲液洗涤后加入甲醇固定,晾干后用 0.1%结晶紫溶液染色,洗涤 96 孔细胞培养板,室温风干后,加入冰乙酸复溶后拍照处理。应用 Excel 2019 软件进行统计分析,使用 GraphPad Prism 8 作图。

1.2.6 超微结构的观察

取 MRSA 菌液(10^6 CFU/mL)的菌悬液,以加入不同体积的大黄酸溶液,使其终浓度分别为 $1\times$ MIC、 $2\times$ MIC 和 $3\times$ MIC,不加药为对照组,在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 4 h 后,制备电镜样品,用扫描电镜观察菌体的形态变化。

1.2.7 大黄酸对细胞质膜去极化及细胞膜通透性的影响

DISC3(5)是一种亲脂性的细胞膜荧光染料, DISC3(5)在与细胞膜结合后其荧光大大增强, 当细胞质膜通透性发生改变时, DISC3(5)染料会嵌入到膜双分子层中的疏水性环境中, 在整个细胞膜上扩散, 使整个细胞膜染色, 从而使荧光强度明显增强。取 150 μL MRSA 菌悬液(10^6 CFU/mL)于黑色 96 孔板中, 分别加入 50 μL 疏水性细胞膜染料 DISC3(5)和 50 μL 荧光染料 PI, 避光孵育 30 min。在激发波长 660 nm 和发射波长 675 nm 处测定加入大黄酸溶液($2\times\text{MIC}$)前后的 DISC3(5)荧光强度的变化, 在激发波长 530 nm 和发射波长 620 nm 处测定加入大黄酸溶液($3\times\text{MIC}$)前后 PI 荧光强度的变化, 以无菌超纯水作为对照, 通过多功能酶标仪进行测试, 观察大黄酸对细胞质膜去极化以及细胞膜通透性的影响, 实验重复 3 次。使用 GraphPad Prism 8 绘制时间-荧光强度变化图。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌浓度

通过二倍稀释法测定了大黄酸对 MRSA 的抑制作用, 当大黄酸浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$ 时, 孔内菌液呈现澄清状态, 确定大黄酸对 MRSA 的 MIC 为 8 $\mu\text{g/mL}$, 说明大黄酸能有效抑制 MRSA 的生长。

2.2 大黄酸对 MRSA 的动态抑菌效果

通过时间点取样的方式测定大黄酸对 MRSA 的动态抑菌效果, 结果如图 1 所示。从图 1 中观察到在 1 h 取样时对照组和 $1\times\text{MIC}$ 、 $2\times\text{MIC}$ 组并无明显菌落数区别, 但 $3\times\text{MIC}$ 组已经无明显菌落生长; 在 8 h 取样时, 对照组进入稳定生长状态, 而 $1\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 组出现了不同程度的抑制生长趋势, $1\times\text{MIC}$ 组生长速度出现减缓, $2\times\text{MIC}$ 组则出现了明显的生长抑制作用, 说明大黄酸对 MRSA 的生长和繁殖有明显的抑制作用, 而且抑制作用的强弱与大黄酸浓度的关系呈现正相关。

2.3 不同时间下大黄酸对凋亡坏死的影响

DAPI 和 PI 染色观察细菌在大黄酸作用 0、4、

8 和 12 h 后的存活状态, 如图 2、图 3 所示, 对照组随着时间增加并未出现明显的荧光变化, 说明并未出现大量细菌的死亡, 但实验组随着大黄酸作用时间的增加, PI 的荧光强度与面积出现明显增加, DAPI 的荧光强度与面积出现明显减弱, 说明大黄酸引起了细菌的死亡, 并提示大黄酸对细胞膜有损伤作用。

2.4 对生物膜内存活菌的影响

大黄酸作用 12 h 后细菌的存活量如图 4A 所示, 对照组的生物膜内细菌存活菌落数为 $12.57\pm 1.40 \text{ Log}_{10}(\text{CFU/mL})$, 实验组随着大黄酸浓度的增加, 生物膜内细菌存活菌落数明显下降, 在浓度 $2\times\text{MIC}$ 时, 生物膜内细菌存活菌落数降低至 $6.00\pm 0.82 \text{ Log}_{10}(\text{CFU/mL})$, 结合结晶紫染色图 4B, 更加明显地看出大黄酸对生物膜的破坏作用, 说明大黄酸能够有效地抑制生物膜的形成, 并在生物膜屏障保护下, 仍然有效地减少生物膜内细菌的存活数量。

2.5 扫描电镜超微结构观察

扫描电镜结果如图 5 所示, 对照组的细菌大小均一、状态饱满、表面光滑无凹陷, 而且不同的细菌之间存在连接情况, 提示细菌状态较好, 能够进行正常生长和繁殖; $1\times\text{MIC}$ 大黄酸处理组的细菌大小不均一, 相互之间几乎无连接, 而且出现部分细菌破裂的现象; $2\times\text{MIC}$ 大黄酸处理组细菌表面出

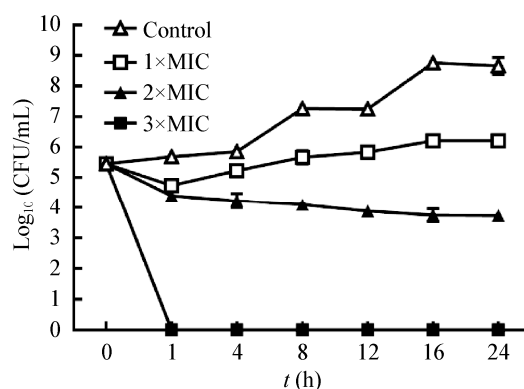


图 1 动态抑菌曲线图

Figure 1 Dynamic antibacterial curve

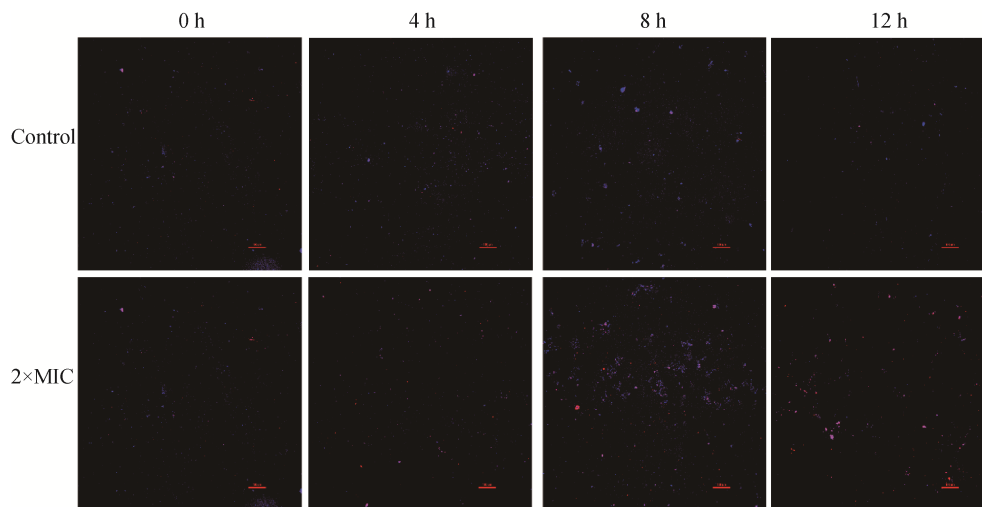


图2 大黄酸作用下 MRSA 凋亡情况图

Figure 2 MRSA apoptosis under the action of rhein

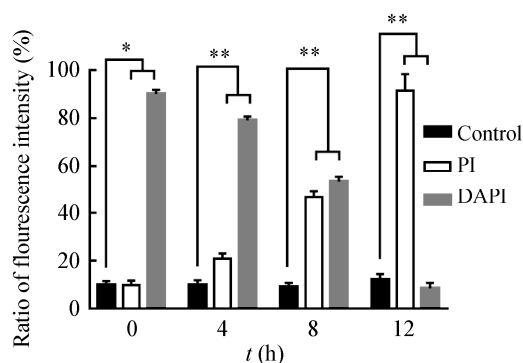


图3 DAPI/PI 荧光强度变化图

Figure 3 DAPI/PI fluorescence intensity change diagram

注: *: 与对照组相比, 差异显著($P<0.05$); **: 与对照组相比, 差异极显著($P<0.01$). 下同

Note: *: Compared with the control group, the difference is significant ($P<0.05$); **: Compared with the control group, the difference is extremely significant ($P<0.01$). The same in following figures

现皱缩, 细菌出现大量破裂; $3\times\text{MIC}$ 大黄酸处理组细菌在视野内几乎全部破裂, 提示大黄酸能够有效地抑制 MRSA 的分裂, 而且能够破坏 MRSA 的菌体形态。

2.6 大黄酸对细胞质膜去极化及细胞膜通透性的影响

由图 6 可知, 在前 8 min 未加入大黄酸时, DISC3(5)组荧光强度较稳定;加入大黄酸后, $2\times\text{MIC}$

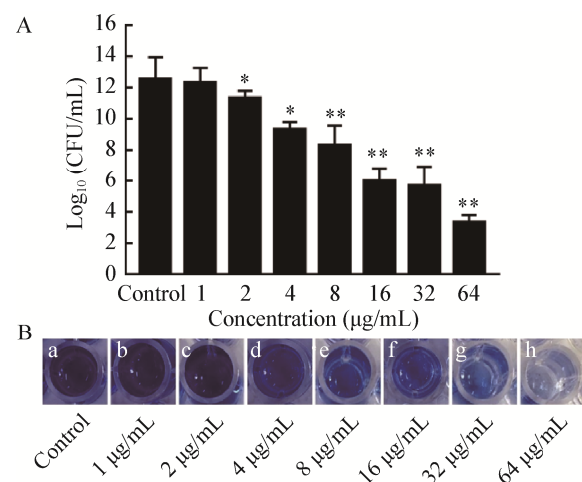


图4 生物膜内存活菌落数

Figure 4 Number of surviving bacterial colonies

注: A: 不同浓度大黄酸作用 12 h 后 MRSA 的存活量; B: 不同浓度大黄酸作用 12 h 后结晶紫染色图。*: 与对照组相比, 差异显著($P<0.05$); **: 与对照组相比, 差异极显著($P<0.01$)

Note: A: Survival of MRSA after 12 h of rhein at different concentrations; B: Crystal violet staining after 12 h of rhein at different concentrations. *: Compared with the control group, the difference is significant ($P<0.05$); **: Compared with the control group, the difference is extremely significant ($P<0.01$)

实验组荧光强度明显增强, 而对照组则出现了降低趋势, 说明大黄酸有较强的细胞质膜去极化作用, 使细胞膜电位发生变化, 细胞质子动力势丧失, 从而引起细菌的死亡。

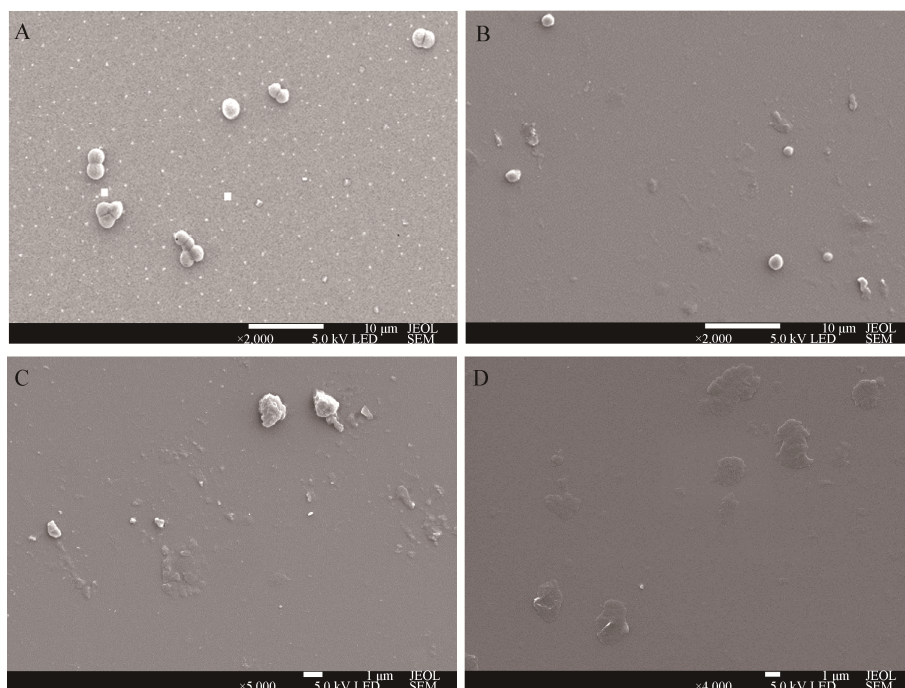


图5 不同浓度大黄酸对 MRSA 形态的影响

Figure 5 The effect of different concentrations of rhein on the morphology of MRSA

注: A: 对照组; B: 1×MIC 作用 4 h 后 MRSA 形态; C: 2×MIC 作用 4 h 后 MRSA 形态; D: 3×MIC 作用 4 h 后 MRSA 形态

Note: A: Control group; B: MRSA form after 1×MIC treatment for 4 h; C: MRSA form after 2×MIC treatment for 4 h; D: MRSA form after 3×MIC treatment for 4 h

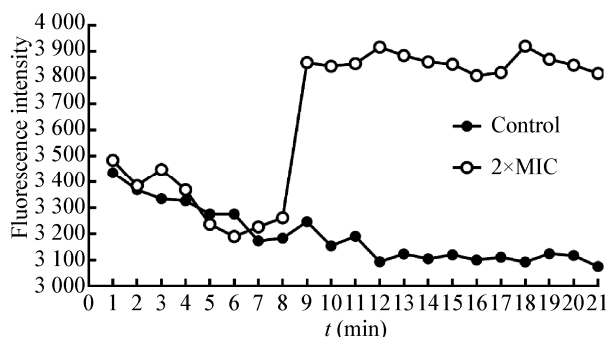


图6 大黄酸对 MRSA 细胞质膜去极化的影响

Figure 6 The effect of rhein on depolarization of MRSA cell plasma membrane

由图 7 可知, 在前 8 min 未加入大黄酸时, 对照组和实验组之间的 PI 荧光强度无明显差别; 在加入大黄酸后, 3×MIC 实验组荧光强度明显增强, 而对照组荧光强度则比较稳定, 提示大黄酸能够影响细胞膜的通透性, 使荧光强度发生变化。

3 讨论与结论

抗生素抗菌研究的基础需要通过抗菌机制的

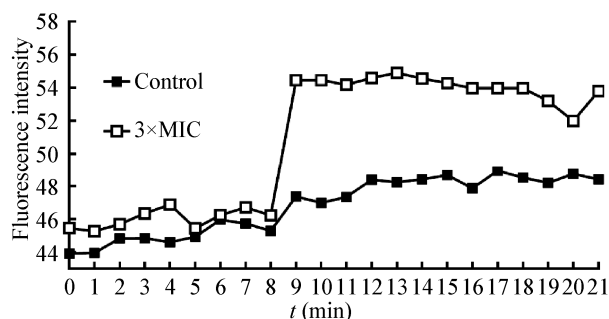


图7 大黄酸对 MRSA 细胞膜通透性的影响

Figure 7 The effect of rhein on MRSA cell membrane permeability

研究来提供应用的科学依据。目前由于中草药有效成分复杂, 从而导致对中草药抗菌机制的研究相对较少^[11]。李妍等^[12]采用微量稀释法, 测定了安石榴苷对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度, 从细菌生长曲线、碱性磷酸酶活性、钾离子(K^+)泄漏及胞内外 ATP 酶含量, 结合流式细胞术、透射电镜和 SDS-PAGE 谱带, 考察了安石榴苷对菌体生长特性、膜

损伤及可溶性蛋白的影响,结果表明,安石榴苷能够显著影响金黄色葡萄球菌的细胞壁完整性及细胞膜通透性,而且对菌体蛋白具有一定抑制作用。

本实验对大黄酸抗 MRSA 的抗菌机制进行了初步探究,从大黄酸的动态抑菌效果、对细菌凋亡的影响、细胞膜的通透性等方面进行了研究探讨,研究表明大黄酸在 $2\times\text{MIC}$ 浓度下能显著抑制 MRSA 的生长和繁殖, $3\times\text{MIC}$ 浓度下几乎无明显 MRSA 生长;通过扫描电镜证明在不同浓度大黄酸作用 4 h 后菌体的形态发生变化,从而影响 MRSA 的生长和繁殖;通过建立生物膜模型,说明生物膜屏障下, $16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的大黄酸仍然能够有效抑制 MRSA 的生长和繁殖;在 $2\times\text{MIC}$ 大黄酸作用 4 h 后,通过免疫荧光染色法(DAPI/PI),观察 MRSA 的凋亡情况,证明大黄酸能够引起 MRSA 的凋亡;通过荧光分析法,发现加药前后 DISC3(5)、PI 的荧光强度发生明显变化,说明大黄酸能够影响 MRSA 细胞质膜的去极化和细胞膜的通透性。

综上所述,大黄酸能够显著抑制 MRSA 的正常生长和繁殖,其作用机制是通过影响细胞膜的通透性从而发挥抑制和杀伤 MRSA 的作用,这为进一步研究大黄酸的作用机制提供了理论基础和科学依据。

REFERENCES

- [1] Liu CL, Sun ZY, Chen ZJ, Zhu XH, Li L, Zhang B, Tian L, Wang B, Zhu Q, Wang Y. Drug resistant changing of *Staphylococcus aureus* from the years of 2006 to 2011[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(6): 467-472 (in Chinese)
刘彩林, 孙自镛, 陈中举, 朱旭慧, 李丽, 张蓓, 田磊, 王斌, 朱琴, 汪玥. 2006-2011 年金黄色葡萄球菌耐药性变迁分析[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(6): 467-472
- [2] Zhang Y, Qiao MY, Wang X. Prevalence of *Staphylococcus aureus* contamination in infant foods and the detection of antibiotic resistance genes and new enterotoxin genes[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(11): 280-285 (in Chinese)
张阳, 乔明宇, 王新. 婴幼儿食品中金黄色葡萄球菌污染情况及其耐药基因和新型肠毒素基因的检测[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 280-285
- [3] Zhu JC, Wei LH, Yang YQ, Shao HX, Zou FM, Liu G, Wu L, Li JC. Clinical distribution and drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2017, 27(7): 1462-1465 (in Chinese)
朱吉超, 魏莲花, 杨永清, 邵海鑫, 邹凤梅, 刘刚, 吴玲, 李军春. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(7): 1462-1465
- [4] Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, MacKenzie FM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, 39(4): 273-282
- [5] Moody J, Hickok J, Septimus E. Infection prevention practices in adult ICUs in a large community hospital system experiencing sustained reduction in healthcare-associated (HA) MRSA infections[J]. American Journal of Infection Control, 2011, 39(5): E94
- [6] Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(11): 7687-7692
- [7] Wang F, Zhu DM, Hu FP, Ruan FY, Ni YX, Sun JY, Xu YC, Zhang XJ, Hu YJ, Ai XM, et al. CHINET 2009 surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2010, 10(5): 325-334 (in Chinese)
汪复, 朱德妹, 胡付品, 阮斐怡, 倪语星, 孙景勇, 徐英春, 张小江, 胡云健, 艾效曼, 等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(5): 325-334
- [8] Liu YN, Li XF, Ban XX, Jiang AW. The review on active antibacterial ingredients of Chinese medicine and the antibacterial mechanism[J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2015, 8(8): 1012-1017 (in Chinese)
刘云宁, 李小凤, 班旭霞, 姜爱雯. 中药抗菌成分及其抗菌机制的研究进展[J]. 环球中医药, 2015, 8(8): 1012-1017
- [9] Gu JW, Zheng CX, Zhang AH, Hasuo H, Akasu T, Yang WT, Yang LB, Xia X, Ma Y. Effects and wavelet spectral entropy analysis of *rhubarb extracts rhein* on synaptic transmission in rat hippocampal cal area *in vitro*[J]. Chinese Medical Journal, 2005, 118(10): 817-823
- [10] Wang XD, Li L, Han YP. Synthesis and antibacterial activity of derivatives of rhein[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2018, 38(2): 105-111 (in Chinese)
王兴达, 李蕾, 韩泳平. 大黄酸衍生物的合成及其抑菌活性研究[J]. 林产化学与工业, 2018, 38(2): 105-111
- [11] Zhang HR, Meng SX, Cao J, Fan WH, Wang YF, Li Q. Antibacterial mechanisms of endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum* on *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 157-162 (in Chinese)
张慧茹, 孟素香, 曹健, 范文慧, 王钰飞, 李强. 绞股蓝内生真菌抗大肠杆菌抗菌机制的研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 157-162
- [12] Li Y, Song CQ, Zhou BH. Screening of antibacterial activity of punicalagin and its mechanism of action against *Staphylococcus aureus*[J]. China Pharmacist, 2020, 23(8): 1492-1497 (in Chinese)
李妍, 松长青, 周本宏. 安石榴苷的抗菌活性筛选及对金黄色葡萄球菌的作用机制研究[J]. 中国药师, 2020, 23(8): 1492-1497