

文章编号: 1674-2869(2016)03-0226-05

# 纳米氧化铜与庆大霉素协同抗 MRSA 作用的研究

马璐璐, 吴杰, 吕中\*

武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430074

**摘要:** 筛选具有协同抗耐药菌活性的纳米材料与抗生素组合是解决抗生素耐药问题的有效手段之一。采用水热法合成粒径为 20 nm 的氧化铜纳米颗粒, 通过抑菌圈法测定对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 具有明显耐药性的抗生素庆大霉素、环丙沙星、哌拉西林、头孢呋辛和头孢噻肟与纳米氧化铜的联合抗菌作用, 筛选具有协同作用的纳米氧化铜-抗生素组合。通过棋盘法测定纳米氧化铜-抗生素组合的部分抑菌浓度指数 (FIC), 并在此基础上测定两者对 MRSA 的时间-杀菌曲线。实验结果表明纳米氧化铜与庆大霉素联用比两者单独使用的抑菌圈面积增大 0.88 倍, FIC 值小于 0.5, 两者联用能够显著抑制细菌生长。

**关键词:** 纳米氧化铜; 庆大霉素; MRSA; 协同抗菌作用

中图分类号: R446.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2016.03.004

## Synergistic Antibacterial Effect of CuO Nanoparticles Combined with Gentamicin Against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus

MA Lulu, WU Jie, LYU Zhong\*

School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China

**Abstract:** Screening the combination of antibiotics and nanomaterials which has synergy antibacterial activity against drug-resistant bacteria is one of the effective ways to solve the problem of antibiotic resistance. The CuO nanoparticles with size around 20 nm were prepared by the hydrothermal method. The antibacterial effects of the CuO combined with antibiotics of gentamicin, ciprofloxacin, piperacillin, cefuroxime and cefotaxime, which are resistant to methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) were determined by the inhibition zone test. The fractional inhibitory concentration index (FIC) of the combination of CuO and gentamycin was determined by the checkerboard method, and time-kill curves against MRSA were also determined. The results show that the inhibition zone's area of the combination increases by 88 % than that of the two components used separately, and FIC value is less than 0.5. The combination of CuO with gentamycin significantly inhibits the growth of MRSA.

**Keywords:** CuO nanoparticles; gentamicin; MRSA; synergistic antibacterial effect

## 1 引言

由于抗生素的广泛使用甚至滥用,许多细菌对抗生素产生耐药性,使得抗生素的使用遇到瓶颈,开发新的能有效对抗耐药菌的药物迫在眉睫<sup>[1-3]</sup>。近年来随着人们对纳米材料抗菌作用及机

理的研究不断深入,人们发现纳米材料通过多种途径作用于细菌,使细菌不易产生耐药性<sup>[4]</sup>。在无机纳米抗菌材料中,纳米银由于具有较强的抗菌作用被广泛研究和应用,但纳米银对人体及环境都具有较强毒性,人们开始将目光转向毒性较低金属氧化物,如纳米氧化锌、氧化镁、氧化铜及

收稿日期: 2016-03-03

基金项目: 国家自然科学基金(21371139)

作者简介: 马璐璐, 硕士研究生. E-mail: 330928156@qq.com

\*通讯作者: 吕中, 博士, 教授. E-mail: zhonglu@wit.edu.cn

二氧化钛等<sup>[5]</sup>,这些金属氧化物结构稳定、能长时间发挥抗菌作用.其中,氧化铜是一种多功能的纳米材料,如用于储磁、能量转换、电极、电池及催化剂等,其价格比银低,化学物理性质稳定<sup>[6]</sup>,此外,纳米氧化铜对大肠杆菌、枯草杆菌、沙门杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌等具有较好的抗菌活性<sup>[7-8]</sup>.

将纳米材料与抗生素联合抗菌,则纳米材料有可能破坏耐药菌对抗生素的耐药机制,使抗生素重新发挥抗菌作用.目前有关纳米材料与抗生素协同抗菌作用研究报道较少,McShan<sup>[9]</sup>等报道新霉素与纳米银联用对鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)具有明显的协同抗菌效果,Luo<sup>[10]</sup>等报道纳米氧化锌和头孢曲松钠联合作用具有协同作用.但有关氧化铜与抗生素的协同作用还未见报道.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是临床最常见的耐药菌,MRSA感染会引起肺炎、伪膜性肠炎、败血症、脓毒血症等疾病发生,MRSA成为医院感染的重要病原菌之一<sup>[2]</sup>.寻找能有效抗MRSA感染的抗生素与纳米材料组合,对治疗MRSA引起的感染具有重要意义.

本研究采用水热法合成纳米氧化铜,测定其与对MRSA具有显著耐药性的抗生素的联合抗菌效果,筛选具有协同抗菌作用的抗生素与纳米氧化铜组合,以期抗MRSA感染的新药研发提供实验基础.

## 2 实验部分

### 2.1 试剂与仪器

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (S. aureus, ATCC 9118) 由华中科技大学生命科学院提供;MRSA由武汉市第三人民医院提供.醋酸铜  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$  购自上海阿拉丁试剂有限公司;4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)试剂购自Sigma公司;庆大霉素(GEN)、头孢呋辛(CXM)、头孢噻肟(CTX)、哌拉西林(PIP)、环丙沙星(CIP)、阿奇霉素(AZI)、万古霉素(VAN)和复方新诺明(SXT)抗生素纸片购自Oxoid公司;硫酸庆大霉素(Gentamicin Sulfate)注射液购自宜昌人福药业有限公司,纯度>99.9%;Mueller-Hinton(MH)培养基购自奥博星有限公司.

722E可见分光光度计,天津市普瑞仪器有限公司生产;D8 ADVANCE型X-射线衍射仪(XRD),德国Bruker公司生产;S-4800 FEG型扫描

电子显微镜(SEM),日本Hitachi公司生产.

### 2.2 实验方法

2.2.1 纳米氧化铜的合成与表征 将2 mmol的  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  放入含30 mL HEPES溶液的50 mL圆底烧瓶中,调pH为10.4,将混合物搅拌并超声处理,直到  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  完全溶解在HEPES溶液中.然后将溶液倒入50 mL聚四氟乙烯反应釜,120℃反应6 h.待反应釜冷却至室温后,离心,用去离子水洗涤5次,无水乙醇洗涤1次,60℃烘箱烘干,收集样品.

所制备的纳米氧化铜组分采用XRD进行表征,  $\text{Cu K}\alpha = 0.154\ 06\ \text{nm}$ ,扫描范围为20~80°;利用SEM对纳米氧化铜的形貌及粒径分布进行表征,操作压力为5 kV.

2.2.2 抑菌圈测定 实验方法见参考文献<sup>[11]</sup>.在MH固体培养基上均匀涂布100 mL  $10^8\ \text{CFU/mL}$  MRSA菌液,贴上抗生素纸片,35℃恒温培养18 h后,测量抑菌圈的直径.

为测定CuO与抗生素联用的抗菌活性,可在抗生素纸片上滴加10 mL 1 mg/mL CuO溶液,然后内贴在涂布菌液的固体培养基上,35℃恒温培养18 h后,测量抑菌圈的直径.所有实验重复3次.

2.2.3 纳米氧化铜与抗生素联用的部分抑菌浓度指数(FIC)测定 采用稀释法测定CuO与GEN分别作用MRSA的最低抑菌浓度(MIC)<sup>[12]</sup>.将CuO与GEN在4×MIC到1/32×MIC抑菌浓度范围内分别倍比稀释成8个抑菌浓度,将不同抑菌浓度的两种抗菌药物按棋盘法设计<sup>[13]</sup>,两两组合加入试管,每种抗菌药物取0.5 mL,再将1 mL抑菌浓度为  $1 \times 10^6\ \text{CFU/mL}$  菌液与药物混合,35℃恒温培养18 h,记录澄清试管的两种抗菌药物的MIC值,按下式计算FIC指数.以不加抗菌剂的试管作为空白对照,实验重复3次.  $\text{FIC} < 0.5$ ,为协同作用;  $0.5 \leq \text{FIC} < 1$ ,为部分协同作用;  $\text{FIC} = 1.0$ ,为相加作用;  $1 < \text{FIC} < 4$ ,为无关作用;  $\text{FIC} \geq 4$ ,为拮抗作用<sup>[14]</sup>.计算FIC公式如下:

$$\text{FIC} = \frac{\text{MIC}_{[\text{A}] \text{联用}}}{\text{MIC}_{[\text{A}] \text{单用}}} + \frac{\text{MIC}_{[\text{B}] \text{联用}}}{\text{MIC}_{[\text{B}] \text{单用}}}$$

2.2.4 纳米氧化铜与GEN联用对MRSA的时间-杀菌曲线 将8 g/mL CuO、32 g/mL GEN或8 g/mL CuO+32 g/mL GEN混合液分别与  $1 \times 10^6\ \text{CFU/mL}$  菌液混合,在35℃培养,取不同时间点培养液10 μL,数菌落,绘制菌落-时间曲线.以未加抗菌药物的培养组作为对照.

3 结果与讨论

3.1 纳米氧化铜的合成与表征结果

图 1 (a) 是所合成 CuO 样品的 XRD 图. 所合成样品的衍射峰与单斜晶系的 CuO 标准卡片图谱 (JCPDS 05-0661) 相一致, 且没有杂峰出现, 衍射峰均有较高的强度, 说明合成的样品为结晶度较高 CuO. 图 1 (b) 为水热条件下合成的 CuO 的 SEM 图. 从图中可以看出, 所合成的 CuO 为均一的球型结构, 粒径在 20 nm 左右.

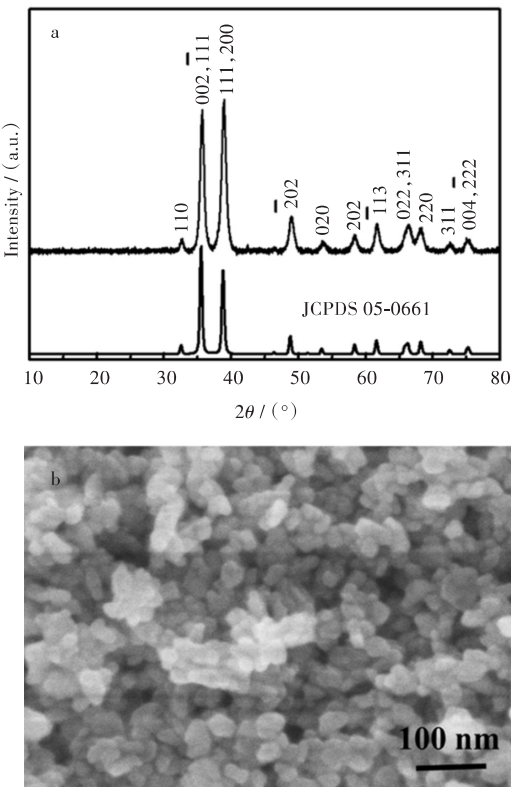


图 1 纳米氧化铜(a)XRD 图谱,(b)SEM 图  
Fig. 1 (a) XRD pattern and (b)SEM image of CuO nanoparticles

3.2 MRSA 的耐药谱

所选取的 8 种抗生素中, GEN 属于氨基糖苷类抗生素, PIP、CTX 和 CXM 属于-内酰胺类抗生素, CIP 属于喹诺酮类抗生素, AZI 属于大环内酯类抗生素, VAN 属于糖肽类抗生素, SXT 属于磺胺类抗生素. 8 种抗生素对 *S. aureus* 和 MRSA 的抑菌圈如图 2 和表 1 所示. 由图可知, 普通的 *S. aureus* 对八种抗生素 CXM、CTX、PIP、CIP、GEN、AZI、VAN 和 SXT 均敏感, 而 MRSA 对其中的 5 种抗生素 CXM、CTX、PIP、CIP 和 GEN 均出现耐药. MRSA 是医院

和社区感染的重要病原菌之一, 其对多种抗生素耐药<sup>[15]</sup>, 这与我们的实验结果一致.

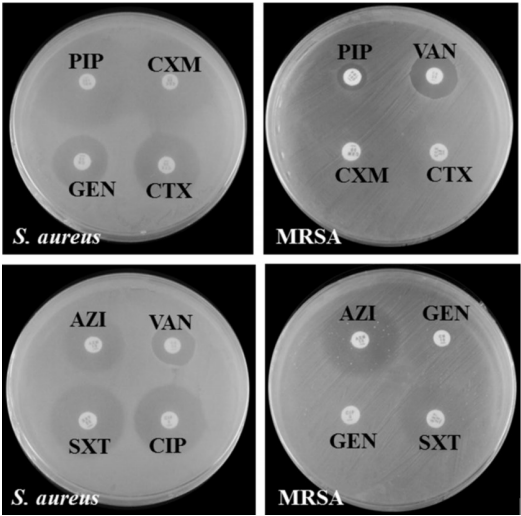


图 2 不同抗生素对 *S. aureus* 和 MRSA 的敏感性实验  
Fig. 2 Susceptibility of antibiotics against *S. aureus* and MRSA

表 1 不同抗生素对 *S. aureus* 和 MRSA 的抑菌圈  
Tab. 1 Innhibition zones of different antibiotics against *S. aureus* and MRSA mm

antibiotic	<i>S. aureus</i>		MRSA	
PIP	36.3	S*	7	R*
CXM	29.9	S	6	R
CTX	23.9	S	6	R
GEN	20.1	S	8.9	R
AZI	21.7	S	23.6	S
VAN	16.1	S	15.3	S
CIP	25.8	S	6	R
SXT	25.4	S	23	S

注: \*S, 敏感; R, 耐药. 根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 标准判定结果<sup>[12]</sup>.

Note: \*S-sensitive; R-resistance. According to the standard of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>[12]</sup>.

3.3 纳米氧化铜与抗生素联用的抗菌活性

上述对 MRSA 耐药的 5 种抗生素与 CuO 组合后的抑菌圈测试结果如图 3 和表 2 所示. 由图可知, CuO 单独作用于 MRSA, 没有明显抑菌圈, 当 CuO 与 GEN 结合后, 抑菌圈面积较单独的抗生素抑菌圈面积增加了 0.88 倍, 而其他抗生素与 CuO 联用抑菌圈面积则没有明显增大, 说明只有 CuO 和 GEN 对 MRSA 具有较好的协同抗菌效果.

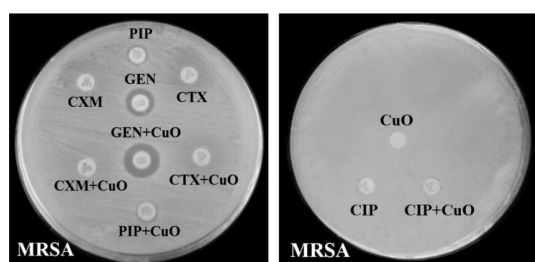


图3 CuO与不同抗生素结合对MRSA的抑菌圈  
Fig. 3 Inhibition zones of different antibiotics against MRSA in presence and absence of CuO

表2 CuO与不同抗生素结合对MRSA的抑菌圈直径  
Tab. 2 Zone of inhibition (mm) of different antibiotics against MRSA (in absence and in presence of CuO) mm

agent	antibiotic (A)	antibiotic+ CuO (B)	increase in Area (+/-)*
GEN	8.9	12.2	0.88
CIP	6	6	0
PIP	7.0	6.6	-0.1
CXM	6	6	0
CTX	6	6	0
CuO	6		

注:\*抑菌圈面积变化计算公式: $(b^2-a^2)/a^2 \times 100\%$ ,  $a$ 、 $b$ 分别为A、B两种药物的抑菌圈半径。

Note:\* Increase in inhibition zone area is calculated as  $(b^2-a^2)/a^2 \times 100\%$ , where  $a$  and  $b$  are the inhibition zones for (A) and (B), respectively.

### 3.4 纳米氧化铜与抗生素联用的FIC值

CuO与GEN单独作用于MRSA的MIC分别是64 g/mL和128 g/mL,将两者混合后对MRSA的MIC为8 g/mL CuO+32 g/mL GEN,由公式计算得到FIC为0.375,小于0.5,说明CuO与GEN联用具有协同抗菌效果.在8 g/mL CuO存在下,GEN对MRSA的MIC从128 g/mL降为32 g/mL.

### 3.5 纳米氧化铜与抗生素联用对MRSA的时间-杀菌曲线

通过测定FIC浓度下药物对MRSA的时间-杀菌曲线,进一步评价CuO与GEN单独使用与联合作用的抑菌作用.由图4可知,8 mg/mL CuO和32 mg/mL GEN单独作用MRSA时抗菌作用很弱.两者联合使用时,完全抑制细菌生长,与CuO与GEN单独作用相比,两者联用使菌落数减小 $3.8 \times 10_{10}$  CFU/mL,进一步说明CuO与GEN联用对MRSA具有协同抗菌作用.

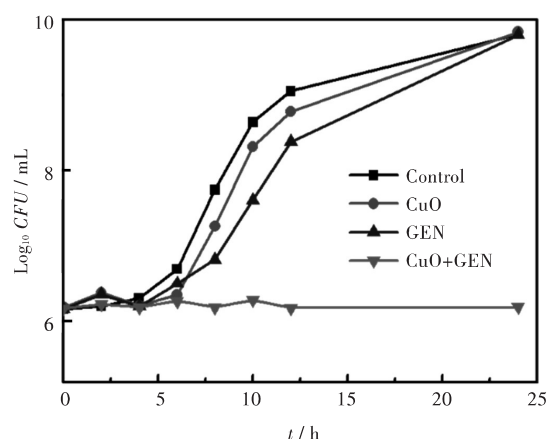


图4 8 mg/mL氧化铜和32 mg/mL庆大霉素单独或联合使用对MRSA的时间-杀菌曲线

Fig. 4 Time-Kill curves of 8  $\mu$ g/mL CuO and 32  $\mu$ g/mL GEN alone or in combination against MRSA

## 4 结 语

在对*S. aureus*敏感,对MRSA耐药的5种抗生素GEN、CXM、CTX、PIP和CIP中,CuO只与GEN具有显著的协同抗MRSA作用.两者协同作用机理有待进一步研究.

### 参考文献:

- [1] BROOKS B D, BROOKS A E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance[J]. Advanced drug delivery reviews, 2014, 78: 14-27.
- [2] D'COSTA V M, KING C E, KALAN L, et al. Antibiotic resistance is ancient[J]. Nature, 2011, 477(7365): 457-461.
- [3] FISCHBACH M A, WALSH C T. Antibiotics for emerging pathogens [J]. Science, 2009, 325 (5944): 1089-1093.
- [4] HAJIPOUR M J, FROMM K M, AKBAR A A, et al. Antibacterial properties of nanoparticles[J]. Trends in biotechnology, 2012, 30(10): 499-511.
- [5] 高艳玲,刘熙,王宗贤,等. 纳米金属氧化物对食品污染菌的杀、抑能力研究[J]. 食品科学, 2005, 26 (4): 45-48.
- [6] GAO Y L, LIU X, WANG Z X, et al. Antibacterial effects nano-structural metal oxide's on bacterium contaminated food [J]. Food science, 2005, 26 (4): 45-48.
- [6] DHANESWAR-DAS B C N, PINKEE P, SWAPAN K D. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application[J]. International journal of nanomedicine,



- 2013(8): 889–898.
- [7] 缪玲玲, 杜文姬, 陈昌云, 等. 微波水热法合成纳米氧化铜及抗菌性能[J]. 化工时刊, 2013, 27(8): 10–13.
- MIAO L L, DU W J, CHEN C Y, et al. Microwave assisted hydrothermal synthesis and antibacterial properties of nanosized cupric oxide[J]. Chemical industry times, 2013, 27(8): 10–13.
- [8] AZAM A, AHMED A S, OVES M, et al. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains[J]. International journal of nanomedicine, 2012(7): 3527–3535.
- [9] MCSHAN D, ZHANG Y, DENG H, et al. Synergistic antibacterial effect of silver nanoparticles combined with ineffective antibiotics on drug resistant *Salmonella typhimurium* DT104[J]. Journal of environmental science and health, part C: environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews, 2015, 33(3): 369–384.
- [10] LUO Z, WU Q, XUE J, et al. Selectively enhanced antibacterial effects and ultraviolet activation of antibiotics with ZnO nanorods against *Escherichia coli* [J]. Journal of biomedical nanotechnology, 2013, 9(1): 69–76.
- [11] NOORA M, MANNISTO N A, KARP, et al. In vitro bioluminescence used as a method for real-time inhibition zone testing for antibiotic-releasing composites[J]. British microbiology research journal, 2014, 4(2): 235–254.
- [12] ESPINEL-INGROFF A, CHOWDHARY A, GONZALEZ G M, et al. Multicenter study of isavuconazole MIC distributions and epidemiological cutoff values for *Aspergillus* spp. for the CLSI M38–A2 broth microdilution method[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2013, 57(8): 3823–3828.
- [13] BHUSAL Y, SHIOHIRA C M, YAMANE N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. International journal of antimicrobial agents, 2005, 26(4): 292–297.
- [14] OLAJUYIGBE O O, AFOLAYAN A J. Synergistic interactions of methanolic extract of *acacia meurnsii* de wild with antibiotics against bacteria of clinical relevance[J]. International journal of molecular sciences, 2012, 13(7): 8915–8932.
- [15] STAPLETON P D, TAYLOR P W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation[J]. Science progress, 2002, 85(1): 57–72.

本文编辑:张 瑞



(上接第212页)

- [4] FIELDING M R, GRIGG R, URCH C J. Novel synthesis of oxindoles from carbamoyl chlorides via palladium catalysed cyclisation–anion capture [J]. Chemical communications, 2000, 22(22): 2239–2240.
- [5] ZHANG X, ZENG W, LIANG Y, et al. Copper-catalyzed double C–S bonds formation via different paths: synthesis of benzothiazoles from *N*-benzyl-2-iodoaniline and potassium sulfide [J]. Organic letters, 2014, 16: 876–879.
- [6] ROMAN D S, TAKAHASHI Y, CHARETTE A B. Potassium tert-butoxide promoted intramolecular arylation via a radical pathway [J]. Organic letters, 2011, 13(12): 3242–3245.
- [7] CROPPER E L, WHITE A J P. Ligand effects in the synthesis of *N*-heterocycles by intramolecular Heck reactions [J]. Journal of organic chemistry, 2006, 71: 1732–1735.
- [8] LIZOS D E, MURPHY J A. Concise synthesis of (±)-horsfiline and (±)-coeruleosine by tandem cyclisation of iodoaryl alkenyl azides [J]. Organic biomolecular chemistry, 2003(1): 117–122.
- [9] PARK J W, CHUNG Y K. Hydrogen-free Cobalt–Rhodium heterobimetallic nanoparticle catalyzed reductive amination of aldehydes and ketones with amines and nitroarenes in the presence of carbon monoxide and water [J]. American Chemical Society catalysis, 2015(5): 4846–4850.

本文编辑:张 瑞