

新加达原散联合亚胺培南西司他丁对临床分离多重耐药 大肠埃希菌生物膜的影响

石岩¹, 杨伟峰², 齐文升^{3*}

(1. 航天中心医院, 北京 100049; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;
3. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的:通过实验筛选出产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)且成膜能力最强的大肠埃希菌,探讨新加达原散(MDYS)联合亚胺培南西司他丁(IPM)对其生物膜状态下的干预作用。方法:通过纸片扩散、结晶紫染色法鉴定临床分离的19株耐药大肠埃希菌产酶及生物被膜的形成能力情况,筛出产酶且成膜能力最强大肠埃希菌。通过噻唑蓝(MTT)比色法检测MDYS组和IPM组最低抑菌浓度后,四唑鎓盐(XTT)比色法检测1/2、1/4、1/8 MDYS水提取物最低抑菌浓度(MIC)与1/2、1/4、1/8 IPM MIC单独及联合用药效果筛选最佳用药浓度,BioFlux动态观察所选取最佳联合用药浓度对大肠埃希菌生物膜内细菌数量及生物膜形成的影响,并用激光共聚焦扫描显微镜观察活菌/死菌的分布。最后通过扫描电镜静态观察药物治疗后细菌的形态学变化。结果:E5E7菌株为产ESBL且成膜能力最强大肠埃希菌。MTT比色法检测结果显示,IPM、MDYS水提取物对E5E7菌株的MIC值分别为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $250\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,XTT比色法检测结果显示,与空白组比较,1/2、1/4、1/8 MDYS水提取物MIC及联合用药组可显著减少生物膜活菌量($P<0.01$),随IPM浓度减小,抑制作用减弱。与单用相同浓度的IPM组比较,联合用药组协同抑制生物膜活菌量显著增强($P<0.01$)。与单用相同浓度的MDYS组比较,1/2 IPM MIC联合1/2、1/4、1/8 MDYS MIC,1/4 IPM MIC联合1/2、1/4 MIC MDYS,1/8 IPM MIC联合1/2、1/4 MDYS MIC活菌量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,1/8 IPM MIC、1/2 IPM MIC对细菌解聚解黏附作用不明显。当使用1/2、1/4 MDYS水提取物MIC时膜面积明显减小。在IPM与MDYS联合用药时,与空白组或者单用IPM组比较,膜面积变小。共聚焦结果显示,空白组活菌生力旺盛。IPM与MDYS联合用药及MDYS单独使用时可以观察到细菌大多呈红色染色,细菌代谢能力弱,为死菌;在1/2、1/8 IPM MIC时,可观察到代谢活性较强的浮游菌。扫描电镜下结果显示,与空白组和IPM组比较,IPM和MDYS联合用药作用下,分裂周期明显长于空白组,且联合用药组分裂期长度高于单独用药组。结论:体外研究揭示了MDYS联合常用抗生素对多重耐药大肠埃希菌生物膜状态具有抑制作用,MDYS具有增敏和协同抗生素抑菌的作用。

[关键词] 新加达原散; 大肠埃希菌; 生物膜; 亚胺培南西司他丁; 联合疗法; 多重耐药菌株

[中图分类号] R285.5;R966;R378;R978.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)19-0073-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221992

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220322.0927.009.html>

[网络出版日期] 2022-03-23 11:34

Effect of Modified Dayuansan Combined with Imipenem-cilastatin on Biofilm of Clinically Isolated Multidrug-resistant *Escherichia coli*

SHI Yan¹, YANG Weifeng², QI Wensheng^{3*}

(1. Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100049, China;
2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To screen out the extended spectrum beta-lactamase (ESBL) -producing

[收稿日期] 2021-08-29

[基金项目] 中国中医科学院基本科研业务自主选题(49913,49914);北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室开放基金项目(92302);中国中医科学院广安门医院国家中医临床研究示范基地科研专项暨所级科研基金课题(2016s)

[第一作者] 石岩,博士,从事中医研究,E-mail:851725461@qq.com

[通信作者] *齐文升,博士,主任医师,从事急重症中医诊疗研究,E-mail:qwsqws@sohu.com

Escherichia coli with the strongest biofilm-forming ability through experiments, and discuss the effect of modified Dayuansan (MDYS) combined with imipenem-cilastatin and cilastatin sodium on the biofilm of *E. coli*. **Method:** The paper diffusion and crystal violet staining methods were used to identify 19 clinically isolated strains of drug-resistant *E. coli*-induced enzymes and the biofilm-forming ability. The induced enzymes and the *E. coli* with the strongest biofilm-forming ability were screened out. The minimum inhibitory concentration (MIC) value of MDYS and imipenem-cilastatin and cilastatin sodium was determined by 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxamide (XTT) assay. The 1/2, 1/4, and 1/8 MIC of the water extract of MDYS, imipenem-cilastatin and cilastatin sodium alone, and MDYS combined with imipenem-cilastatin and cilastatin sodium was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay to obtain the optimum concentration of drugs. BioFlux dynamically observed the effect of the optimum combined drug concentration on the number of bacteria in the biofilm and the biofilm formation of *E. coli*, and observed the distribution of live/dead bacteria with a laser confocal scanning microscope. Finally, the morphological changes in bacteria after drug treatment were observed statically by scanning electron microscopy. **Result:** E5E7 strain was ESBL enzyme and the *E. coli* with the strongest biofilm-forming ability. The results of MTT assay showed that the MIC values of the water extracts of imipenem-cilastatin and cilastatin sodium and MDYS were $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The results of XTT assay showed that compared with the blank group, the 1/2, 1/4, and 1/8 MIC MDYS groups and the combined drug groups significantly decreased the number of bacteria in the biofilm ($P < 0.01$). The inhibitory effect diminished as the concentration of imipenem-cilastatin and cilastatin sodium decreased. Compared with the imipenem-cilastatin and cilastatin sodium group with the same concentration, the combined drug group improved the inhibitory effect on the number of bacteria in the biofilm ($P < 0.01$). Compared with the MDYS group with the same concentration, 1/2 MIC imipenem-cilastatin and cilastatin sodium combined with 1/2, 1/4, and 1/8 MIC MDYS, 1/4 MIC imipenem-cilastatin and cilastatin sodium combined with 1/2 and 1/4 MIC MDYS, and 1/8 MIC imipenem-cilastatin and cilastatin sodium combined with 1/2 and 1/4 MIC MDYS decreased the number of bacteria ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of BioFlux showed that compared with the blank group, the 1/2 and 1/8 MIC imipenem-cilastatin and cilastatin sodium groups had an insignificant effect on the area of biofilm, whereas the 1/2 and 1/4 MIC MDYS groups significantly decreased the area of biofilm. The results under the scanning electron microscopy showed that as compared with the blank group and the imipenem-cilastatin and cilastatin sodium group, the division cycle was significantly longer under the action of MDYS combined with imipenem-cilastatin and cilastatin sodium. The length of the division cycle in the combined drug group was higher than that in drug alone group. **Conclusion:** *In vitro* studies reveal that MDYS combined with commonly-used antibiotics can inhibit the biofilm status of multi-drug resistant *E. coli*, and MDYS has the effect of enhancing sensitization and inhibiting bacteria with synergistic antibiotics.

[Keywords] modified Dayuansan; *Escherichia coli*; biofilm; imipenem-cilastatin; combination therapy; multiple antibiotic resistant strains

自然界中99%的细菌以生物膜的形式存在^[1]。常规抗生素能有效杀死生长和分裂的浮游状态细菌细胞,但是一旦细菌形成生物膜,便形成了物理屏障,对抗生素的抵抗力是浮游细菌的1 000倍以上^[2-5],当细菌进入生物膜状态时对抗菌剂的抗性增加且难以根除^[6-9]。因此,抗菌治疗可以通过杀死自由漂浮的细菌来抑制感染症状,但往往无法根除,仍嵌入生物膜中的细菌细胞^[10]。生物膜的形成

是大肠埃希菌(*Escherichia coli*)耐药的一个非常重要的途径^[11]。部分中药经研究证实对细菌生物膜的形成或成熟具有一定的破坏和抑制作用,对耐药菌本身也有很好的抑制作用,研究证实这无疑是中国抗菌优势所在。新加达原散(MDYS)处方一些中药已被实验证实中的一些中药对生物膜及细菌耐药具有抑制作用^[12-15]。本研究以多重耐药*E. coli*为研究对象,动静态观察MDYS与亚胺培南西司他丁

(IPM)联合用药对细菌生物膜的作用。本研究意在探索新加达原散联合IPM对多重耐药*E. coli*生物膜抑制作用机制。

1 材料

1.1 菌株 *E. coli*、肺炎克雷伯菌[美国典型培养物保藏中心(ATCC),货号分别为25922、700603]。选取广安门医院2010—2018年病房患者19株临床分离株(见增强出版附件内容)。所有细菌都保存在磁珠上-80℃的低温储存环境中。细菌的工作培养物保持在4℃的琼脂斜面上,并在使用前在LB培养基中传代培养。

1.2 试剂 四唑鎓盐(XTT)、吩嗪硫酸甲酯(PMS)(美国Sigma公司,货号分别为SLBK1057V、BCBM8136V),2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)、结晶紫(美国Amresco公司,货号分别为0765、0528),磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝科技有限公司,货号409L024),酵母提取物、胰蛋白胨、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)药敏纸片(英国Oxoid公司,货号分别为1390139-02、1863590、2419308、2412894),葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司,货号10010518),LIVE/DEAD® Bac Light™ Bacterial Viability Kits(美国Thermo Fisher Scientific公司,货号L70121813798),MDYS颗粒剂(新绿色药业股份有限公司,货号0120917657),IPM(美国INALCO公司,货号12212311213),头孢他啶棒酸(CAC)、头孢噻肟棒酸(CTC)药敏纸片(温州市康泰生物科技有限公司,货号分别为SA1512Z1、SA1513Z1)。

1.3 仪器 BioFlux 200型数控剪切流活细胞自动分析平台、910-0004型专用平板(美国Fluxion Biosciences公司),iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司),E-1010型离子溅射装置、S-3400N型扫描电子显微镜(日本株式会社日立高新技术),KMF240型恒温恒湿培养箱(德国Binder公司),Centrifuge 5415D型离心机(德国Eppendorf公司),FV1000型激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司),MLS-3750型分光光度计(日本三洋电机株式会社),BT25S型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),THZ-D型恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂)。

2 方法

2.1 溶液及药液配制

2.1.1 培养基配制 液体LB培养基,10 g·L⁻¹胰蛋白胨+5 g·L⁻¹酵母提取物+10 g·L⁻¹NaCl,液体含糖LB培养基在液体LB培养基中额外使用2.5 g·L⁻¹葡萄糖补充LB培养基,加超纯水配制,全程pH调至

7.2~7.4,高压灭菌,4℃保存,含糖LB培养基用以促进*E. coli*生物膜的生长。

固体LB培养基,使用超纯水配制,10 g·L⁻¹胰蛋白胨+5 g·L⁻¹酵母提取物+10 g·L⁻¹NaCl+20 g·L⁻¹琼脂粉,pH调至7.2~7.4,高压灭菌,铺板至4℃保存。

2.1.2 溶剂配制 XTT溶剂,XTT粉末加入糖补充的LB培养基中制备1 g·L⁻¹溶液,在70℃水浴中加热完全溶解(全程避光操作)。将PMS粉末溶解在超纯水中,制备3.06 g·L⁻¹的溶液,随后用0.22 μm微孔膜过滤和灭菌,并在4℃避光储存。

噻唑蓝(MTT)溶剂,将TTC粉末加入高压灭菌的PBS中以制备2.5 g·L⁻¹溶液。

2.1.3 MDYS药液配制 MDYS颗粒剂组成为青黛6 g、赤芍30 g、石膏30 g、乳香10 g、草果10 g、白芷15 g、黄芩15 g、熟大黄3 g、柴胡15 g、蝉衣10 g(所有药材由新绿色药业股份有限公司提供饮片,广安门医院药剂科制成生药颗粒共7.5 g/付,生产批号16060066,广安门医院药剂科对每批药品样本进行指纹图谱分析,经药学部专家王丽霞主任中药师鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》相关要求)。

醇提物制备:精确称量MDYS颗粒剂,反复用乙酸乙酯溶解中药颗粒剂,1 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径15 cm,下同),取上清液,直到所收集的乙酸乙酯上清液肉眼观为无色透明;将收集的上清液经旋蒸仪蒸干至粉末状将滤液减压浓缩至膏状,将浸膏置于冷冻干燥机中冷冻干燥。工艺流程为-20℃预冻2 h;-25℃升华干燥48 h;5℃解析干燥24 h。干燥结束后,关闭真空泵,收集干燥粉末样品,-20℃密封保存。称取1 g冻干粉溶解于无水乙醇5 mL中,用0.22 μm微孔膜过滤和灭菌溶液然后等分试样放入极压管中,并在4℃冰箱中储存。对于实验,使用添加LB培养基调整浓度浓度的提取物以供使用。药物溶液的渗透压符合细菌生长的要求。

水提物制备:将乙酸乙酯提取物制剂中剩余的药用10倍量的蒸馏水水浴加热至充分溶解,用超声波仪震荡,加热震荡至少5次,用纱布过滤后合并5次滤液,并将离心除去杂质,用旋转蒸发仪(温度设置45℃,转速设置25转/min)将滤液减压浓缩至膏状,将浸膏置于冷冻干燥机中冷冻干燥。工艺流程为-20℃预冻2 h;-25℃升华干燥48 h;5℃解析干燥24 h。干燥结束后,关闭真空泵,收集干燥粉末样品,-20℃密封保存。称取冻干粉1 g溶解于LB

培养基 5 mL 中,超声波仪充分震荡摇匀,制备 $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔膜过滤和灭菌溶液然后等分试样放入极压管中,并在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存。使用时添加 LB 培养基调整浓度浓度的提取物以供使用。药物溶液的渗透压符合细菌生长的要求。

2.2 实验分组 设置空白组,MTT 法比色检测出 IPM、MDYS 水提物对 E5E7 菌株的最低抑菌浓度 (MIC) 值作为研究基础。根据最佳结果进行给药分组,即空白组、1/8 IPM MIC+1/4 MDYS 水提物 MIC 组、1/8 IPM MIC 组、1/2 IPM MIC 组、1/2 IPM MIC+1/2 MDYS 水提物 MIC 组、1/4 MDYS 水提物 MIC 组、1/2 MDYS 水提物 MIC 组。

2.3 纸片扩散法检测药物敏感性 超广谱 β -内酰胺酶 (ESBL) (AST-GN13 药敏卡法); 菌株均经系统生化鉴定及血清学鉴定。*E. coli*、肺炎克雷伯菌分别作为阴性和阳性对照。ESBL 阳性的菌株均按美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 推荐的方法,将 CTX、CTC、CAZ、CTC 粘贴在涂布细菌密度为 $1 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液 LB 琼脂平板, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温恒湿箱培养 18 h,测量其中任何一对纸片抑菌圈直径相差 $\geq 5 \text{ mm}$,即为产 ESBL 菌株。全自动微生物鉴定/药敏分析仪检测 ESBL 确证试验。

2.4 半定量结晶紫染色法检测细菌生物 于 96 孔板中接种密度为 $1 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对数生长期菌液 $200 \mu\text{L}$ /孔,每 24 h 换液 1 次培养 48 h。洗板,加入结晶紫 $50 \mu\text{L}$ 并染色 2 min,95% 乙醇脱色,酶标仪测定波长为 450 nm 处的吸光度 A 。

2.5 MTT 比色法检测 *E. coli* MIC LB 培养基稀释取对数期标准和临床分离 (E5E7) 的多重耐药 *E. coli* 菌液至 $A_{600 \text{ nm}}=0.02$,对药物采用标准微量肉汤稀释法测定以上菌株 MIC 值。按照倍比稀释法稀释药液,其中新加达原散水提取物的质量浓度梯度为 $(0.49 \sim 250) \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 原液,抗生素质量浓度范围为 $0.062 \sim 1\ 024 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每一梯度药物加入 $100 \mu\text{L}$ 于 96 孔板中,重复 2 个复孔,再加入菌液 $100 \mu\text{L}$ 。过夜培养,每孔加入 $0.25\% \text{ TTC } 25 \mu\text{L}$,30 min 后观察,有菌生长呈现红色,即为药物的 MIC 值。

2.6 微孔板法检测 *E. coli* 细菌生物膜 LB 培养基稀释取对数期标准和临床 (E5E7) *E. coli* 菌液 $A_{600 \text{ nm}}=0.02$,接种于 96 孔板放入恒温恒湿箱进行培养 24 h。在第 2 列 B~D 行依次加入 (1/2、1/4、1/8 MIC) MDYS 水提取物 $100 \mu\text{L}$,第 3~5 列 B~D 行依次加 1/2 MDYS 水提取物 MIC $50 \mu\text{L}$ 、第 6~8 列 B~D 行依次加入 1/4

MDYS 水提取物 MIC $50 \mu\text{L}$ 、第 9~11 列 B~D 行依次加入 1/8 MDYS 水提取物 MIC $50 \mu\text{L}$,在第 E 行 2~5 列加入 1/2 IPM MIC $100 \mu\text{L}$ 、第 E 行 6~8 列加入 1/4 IPM MIC $100 \mu\text{L}$,第 E 行 9~11 列加入 1/8 IPM MIC $100 \mu\text{L}$,第 3~5 列 B~D 行依次加入 1/2 IPM MIC $50 \mu\text{L}$ 、第 6~8 列 B~D 行依次加入 1/4 IPM MIC $50 \mu\text{L}$ 、第 9~11 列 B~D 行依次加入 1/8 IPM MIC $50 \mu\text{L}$ 。空白对照组加入相同体积的培养基,在第 1 列和第 12 列及第 1 行和第 8 行的每个孔中加入培养基 $200 \mu\text{L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温恒湿培养 24 h 后,用 $0.9\% \text{ NaCl}$ 洗涤平板两次除去悬浮细菌。加入 XTT-PMS 来检测生物膜中活菌的数量,1.5 h 后测量 450 和 655 nm 处的外径值。

2.7 Bioflux 和活/死菌动态检测 *E. coli* 细菌生物膜形态学变化 用无菌手术刀切开 Bioflux 系统 24 孔培养板所用孔的薄膜后,先后润湿,静置 1 h 后入口与出口分别加入 $100 \mu\text{L}$ 培养基加力,静置 2 h;入口加入培养基 1 mL ,出口加入培养基 $100 \mu\text{L}$ 加力。始终置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温加热板培养,待细菌成膜后分别给药,即空白组、1/8 IPM MIC+1/4 MDYS 水提物 MIC 组、1/8 IPM MIC 组、1/2 IPM MIC 组、1/2 IPM MIC+1/2 MDYS 水提物 MIC 组、1/4 MDYS 水提物 MIC 组、1/2 MDYS 水提物 MIC 组,加 $0.5 \text{ dyne} \cdot \text{cm}^{-2}$,最后吸出孔内液体并进孔加入 LIVE/DEAD[®] Bac Light[™] Bacterial Viability Kits 新鲜配制的染色剂 $200 \mu\text{L}$,最终稀释浓度为 10 、 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。加力后进行 20 min 染色,后冲洗 5 min;激光共聚焦扫描显微镜扫描拍照。

2.8 扫描电镜静态检测 *E. coli* 细菌生物膜形态学变化 在 24 孔板的每孔内加入 $0.18 \text{ cm} \times 0.18 \text{ cm}$ 洗净、灭菌后的玻璃片;每孔加入菌液 1 mL ,按 2.1 项下方法培养生物膜,使成熟生物膜长于玻璃片上。设立空白组与加药组,加药组加入 1 mL 药液分组同 2.2 项,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中培养 24 h。先后用加入 $4\% \text{ 戊二醛}$ 前固定,加入 $1\% \text{ 钼酸}$ 后固定,用体积分数为 50% 、 70% 、 90% 、 100% 的乙醇脱水各 1 次,脱水时间为 $15 \sim 20 \text{ min}$ 后取出玻璃片,加入 $100\% \text{ 叔丁醇}$,在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱放置 30 min,将样品置真空冷冻干燥仪冷冻干燥 $3 \sim 4 \text{ h}$,样品台粘上导电胶带,用镊子小心将玻璃片从样品室取出,粘在样品台上,最后喷金后扫描电子显微镜观察并拍照。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 26.00 统计软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 t 检验,采用 χ^2 检验利用 Bioflux Montage 图像处理软件的

Fluorescence Adhesion 及 Percent area 模块进行图像自动分析并统计,利用 GraphPad Prism 5.0 绘图,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 19株 *E. coli* 菌产 ESBL 酶检测结果 研究结果显示,本实验中的 19 株 *E. coli* 中除 E6B5、E6B2 外均产 ESBL 酶。见表 1。

表 1 19 株临床多重耐药 *E. coli* 抑菌圈直径及产 ESBL 情况
Table 1 Diameter of inhibition zone and ESBL production of 19 clinical multiple drug resistance *E. coli* strains

细菌标号	产 ESBL 情况	抑菌圈直径/cm			
		CTX	CTC	CAZ	CAC
E4B4	+	1.3	2.7	2.4	2.4
E5B5	+	0.8	2.2	1.6	2.5
E5A11	+	1.0	2.4	1.9	2.5
E5B4	+	1.2	2.7	2.2	2.5
E6B5	-	0.8	1.0	0.7	0.8
E5A2	+	0.9	2.2	1.9	2.1
E5A4	+	1.0	2.5	2.1	2.4
E4B6	+	0.9	2.0	1.5	2.5
E5A7	+	1.1	2.5	1.8	2.4
E4C8	+	0.9	2.5	1.5	2.4
E4C3	+	1.2	2.5	2.3	2.6
E5A6	+	1.5	2.7	2.7	2.9
E6B4	+	1.4	2.5	2.3	2.3
E5E7	+	0.8	2.2	1.3	2.4
E6B2	-	2.9	3.2	2.0	2.1
E5B2	+	1.4	2.5	2.1	2.4
E5A12	+	1.2	2.4	2.1	2.3
E5E5	+	1.0	2.4	1.6	2.5
E4C12	+	0.9	2.1	1.5	2.2
<i>E. coli</i>	-	0.8	0.8	0.9	1.0
肺炎克雷伯菌	+	2.0	2.6	2.2	2.9

3.2 细菌生物膜成膜能力检测结果 细菌生物膜的半定量检测显示,E5E7(标本类型为痰)、E5E5(标本类型为尿)、E5A11(标本类型为尿)、E4C12(标本类型为尿)、E5B2(标本类型为尿)成膜能力较强,见表 2。选取成膜能力最强进行成膜状态联合用药。

3.3 最佳联合用药浓度结果 MTT 比色法检测出 IPM、MDYS 水提物对 E5E7 菌株的 MIC 值分别为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以此为依据确定微量棋盘法浓度。与空白组比较,1/2、1/4、1/8 MDYS 水提物 MIC 及联合用药组可显著减少生物膜活菌量($P <$

表 2 19 株临床多重耐药 *E. coli* 细菌生物膜成膜能力 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Biofilm forming ability of 19 clinical clinical multiple drug resistance *E. coli* strains ($\bar{x} \pm s$)

细菌标号	$A_{450 \text{ nm}}$ (成熟期)	细菌标号	$A_{450 \text{ nm}}$ (成熟期)
E4B4	2.311±0.137	E4C3	2.172±0.159
E5B5	1.366±0.043	E5A6	1.456±0.086
E5A11	2.743±0.018	E6B4	2.150±0.172
E5B4	2.334±0.122	E5E7	3.100±0.021
E6B5	2.287±0.019	E6B2	2.084±0.270
E5A2	2.018±0.168	E5B2	2.415±0.012
E5A4	1.537±0.118	E5A12	2.140±0.245
E4B6	2.064±0.181	E5E5	2.966±0.156
E5A7	2.335±0.121	E4C12	2.627±0.137
E4C8	1.872±0.101	<i>E. coli</i>	1.801±0.102

0.01)。随 IPM 浓度减小,抑制作用减弱。与单用相同浓度的 IPM 组比较,联合用药组协同抑制生物膜活菌量显著增强($P < 0.01$)。与单用相同浓度 MDYS 的比较,1/2 IPM MIC 联合 1/2、1/4、1/8 MDYS MIC,1/4 IPM MIC 联合 1/2、1/4MIC MDYS,1/8 IPM MIC 联合 1/2、1/4 MDYS MIC 活菌量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。将结果联合浓度用于之后实验。

3.4 动态观察联合用药对 *E. coli* 细菌生物膜的影响 BioFlux 观测药物对剪切力下动态生物膜的影响,与空白组比较,1/8 IPM MIC 对细菌解聚解黏附作用不明显,其生物膜面积和光密度略有增大。1/2 IPM MIC 对细菌解聚解黏附作用不明显,其生物膜面积作用减小不明显, A 减小。当使用 1/2、1/4 MDYS 水提取物 MIC 时,可以看到细菌聚集和黏附能力的明显降低,可以观察群落出现松散迹象,膜面积明显减小。在 IPM 与 MDYS 联合用药时,与空白组或者单用 IPM 组比较,均可观察到生物膜松散,膜面积变小,聚集和黏附能力下降的现象。说明 MDYS 和联合用药可以破坏生物膜完整结构。

生物膜的形成可能是 *E. coli* 耐药重要机制,可以阻止外界抗菌物质的进入,增强对抗菌剂的耐受性。使用由细菌生物膜状态筛选的药物浓度用于随实验。在动态生物膜实验中,空白组绿色荧光信号值强,表明活菌生力旺盛。IPM 与 MDYS 联合用药及 MDYS 单独使用时对成熟生物膜具有解聚和脱粘作用,可以观察到细菌大多呈红色染色,细菌代谢能力弱,为死菌;在 1/2、1/8 IPM MIC 时,可观察到代谢活性较强的浮游菌。见图 1、图 2。

表3 MDYS与IPM对*E. coli*成熟期细菌生物膜膜内活菌量的影响
($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of MDYS and IPM on amount of viable bacteria in *E. coli* mature bacterial biofilm ($\bar{x}\pm s$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	A _{450 nm} -A _{655 nm}
空白组		0.534±0.009
1/2 IPM组	0.5	0.510±0.015
1/2 MDYS组	125 000	0.226±0.003 ^{2,4)}
1/2 IPM+1/2 MDYS组	0.5+125 000	0.159±0.003 ^{2,4,6)}
1/4 IPM组	0.125	0.526±0.009
1/2 MDYS组	62 500	0.225±0.003 ^{2,4)}
1/4 IPM+1/2 MDYS组	0.125+62 500	0.185±0.001 ^{2,4,6)}
1/8 IPM组	0.125	0.541±0.014
1/2 MDYS组	125 000	0.226±0.003 ^{2,4)}
1/8 IPM+1/2 MDYS组	0.125+125 000	0.216±0.001 ^{2,4,6)}
1/2 IPM组	0.5	0.510±0.015
1/4 MDYS组	62 500	0.250±0.007 ^{2,4)}
1/2 IPM+1/4 MDYS组	0.5+62 500	0.213±0.005 ^{2,4,6)}
1/4 IPM组	0.25	0.526±0.009
1/4 MDYS组	62 500	0.250±0.007 ^{2,4)}
1/4 IPM+1/4 MDYS组	0.25+62 500	0.215±0.003 ^{2,4,6)}
1/8 IPM组	0.125	0.522±0.013
1/4 MDYS组	62 500	0.250±0.007 ^{2,4)}
1/8 IPM+1/4 MDYS组	0.125+62 500	0.234±0.005 ^{2,4,5)}
1/2 IPM组	0.5	0.510±0.015
1/8 MDYS组	312 500	0.265±0.011 ²⁾
1/2 IPM+1/8 MDYS组	0.5+312 500	0.254±0.002 ^{2,4,6)}

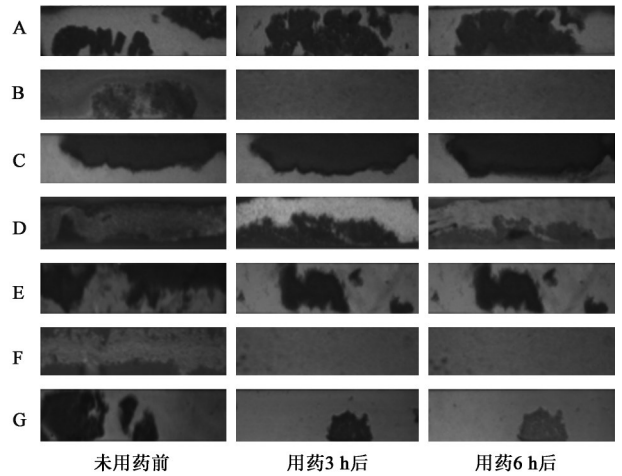
注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与相同质量浓度IPM组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与相同质量浓度MYDS组比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01

3.5 静态观察联合药物对*E. coli*形态变化的影响

空白组*E. coli*具有排列不规则、表面光滑、形态正常、大小均匀的特点。IPM组的分裂期长度没有明显变化。在IPM和MDYS联合用药作用下,分裂周期明显长于空白组,且联合用药组分裂期长度高于单独用药组。在静态成熟生物膜中,IPM与MDYS联合用药时对细菌分裂的抑制作用明显优于IPM。联合杀菌作用可能是由于其抑制细胞壁合成的能力。细胞壁的合成是细菌分裂的重要组成部分,作用机制有待进一步研究。见图3。

4 讨论

导师根据中医“伏邪”理论提出治疗伏邪从清解和透散两方面着手。其中伏邪发则为温病,故性属热邪,无论热邪潜伏,还是外邪入里化热,皆当



注:A.空白组;B.1/8 IPM MIC+1/4 MDYS水提取物MIC组;C.1/8 IPM MIC组;D.1/2 IPM MIC组;E.1/2 IPM MIC+1/2 MDYS水提取物MIC组;F.1/4 MDYS水提取物MIC组;G.1/2 MDYS水提取物MIC组(图2和图3同)

图1 IPM与MDYS联合用药对E5E7的影响(BioFlux,×400)

Fig. 1 Effect of IPM combined with MDYS on E5E7 (BioFlux,×400)

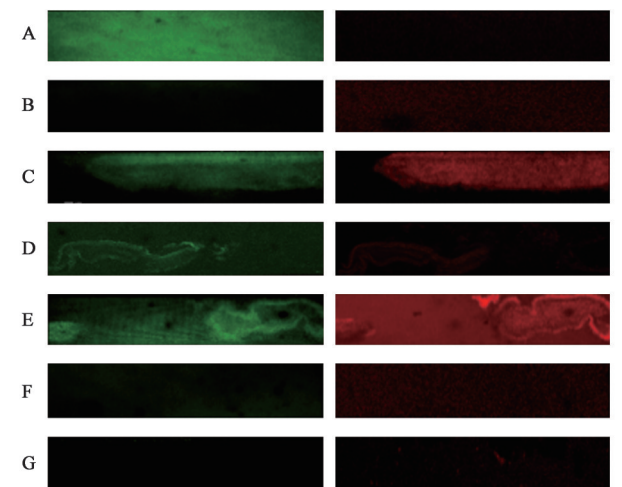


图2 IPM与MDYS联合用药对E5E7的影响(激光共聚焦扫描,×400)

Fig. 2 Effect of IPM combined with MDYS on E5E7 strain (CLSM,×400)

“热者寒之”当清解。邪气内伏,宜调节气机升降,透散外达,给邪以出路,若单用苦寒直折,易冰伏邪气,加重病情当透散故创建由达原饮、升降散、小柴胡汤加减化裁而成,讲求“清热凉血、透膜散结、调节气机升降出入”,其组方特点和配伍方法,具备中医理论和临床治疗特色,比西医治疗有很大的优势和临床价值。

筛选细菌原因:①全球细菌耐药以碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(CRE)引起感染形式最为严峻,给健康和经济带来巨大负担。②欧洲临床微生物

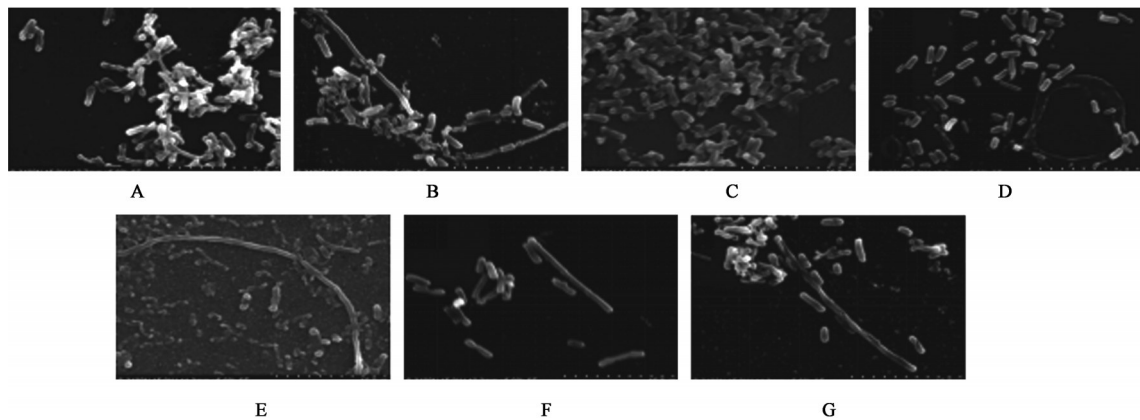


图3 IPM与MDYS联合用药对ESE7的影响(扫描电子显微镜,×5 000)

Fig. 3 Effect of IPM combined with MDYS on ESE7 (SEM, ×5 000)

感染杂志示,2007—2016年中国2 827例医院获得性肺炎患者的病原体肠杆菌的抗性增加^[16]。产ESBL酶的肠杆菌科细菌是引起细菌耐药最大威胁之一,产ESBLs酶的生物膜成膜能力高于非产酶细菌。③2015—2020年全国细菌耐药监测报告均指出,*E. coli*排首位。④抗生素对细菌产生作用主要针对浮游状态具体机制下的细菌,如酶抑制剂抗菌药针对浮游状态产酶细菌,一旦细菌形成生物膜,抗菌药疗效不理想,治疗选择非常有限。对于生物膜状态目前没有有效治疗方式,产ESBL酶的生物膜成膜能力高于非产酶细菌,产ESBL酶的肠杆菌科细菌治疗非常困难,部分中药经研究证实对耐药菌及其生物膜的形成或成熟均具有一定的破坏和抑制作用。⑤根据本课题组前期研究证实MDYS其含药血清有效延缓铜绿假单胞菌耐药,水提、醇提药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、肺炎克雷伯菌生物膜稳定性及抑制了膜内细菌数量^[17-21]。本研究目的是探索联合抗生素的抑菌作用,结合上述原因及本研究目的,对新加达原散与临床常用抗生素对MDR-*E. coli*生物膜状态影响,为临床治疗提供参考。

动态生物膜状态下,抗生素联合MDYS对生物膜状态细菌抑菌效果优于单独使用抗生素,MDYS可能抑制*E. coli*生物膜生长。SEM静态观察对药物对*E. coli*形态学变化,IPM具有抑制细胞壁合成的能力起到杀菌作用,而细胞壁的合成是细菌分裂的重要环节,MDYS和联合用药对*E. coli*细菌分裂有较好的抑制作用明显优于IPM。基于静态和动态生物膜数据的整合,故MDYS联合IPM可能通过渗透到生物膜中并杀死了膜中的细菌,抑制*E. coli*生物膜的生长,可协同对细菌分裂的多个环节进行抑制从而达到更好的疗效。抗生素对浮游细菌的作

用优于生物膜,这与许多文献报道一致。但体外实验有一定局限性:①体外实验表明MDYS可以联合抗生素抑制生物膜状态的细菌,但宿主因素等因素诸多影响,MDYS联合抗生素对体外生物膜状态的细菌是否与体内相同仍有待讨论^[22]。②治疗方案中抑制既定范围内的慢性细菌感染仍有待鉴定^[23]。③新加达原散在体外和体内是否一致仍有待讨论。④本实验只初步证明了MDYS对生物膜状态的细菌抑制作用且基础研究,尚未涉及口服利用度、药代动力学等研究,根据预实验结果,如进一步了解MDYS的抗菌机制,还需进一步进行体内研究、动物实验部分采用含药血清并进行药代动力学、药理学研究以及从分子生物学角度深入探究具体作用机制。体外实验表明MDYS可以联合抗生素抑制生物膜细菌,但宿主因素等因素诸多影响,MDYS联合抗生素对体外生物膜细菌是否与体内相同仍有待讨论;本实验只初步证明了MDYS对生物膜状态的细菌抑制作用且基础研究,尚未涉及口服利用度、药代动力学等研究,根据预实验结果,如进一步了解MDYS的抗菌机制,还需进一步进行体内研究、动物实验部分采用含药血清并进行药代动力学、药理学研究及从分子生物学角度深入探究具体作用机制。

综上所述,MDYS与IPM联合用药,增强*E. coli*对抗生素敏感性,对细菌分裂和生物膜的形成产生抑制,可协同抗生素渗透进入生物膜,对膜内细菌代谢产生抑制,其作用机制仍需进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] COURROL D, LOPES C, PEREIRA C, et al. Tryptophan Silver nanoparticles synthesized by

- photoreduction method: Characterization and determination of bactericidal and anti-biofilm activities on resistant and susceptible bacteria [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2019, doi: 10.1177/1178646919831677.
- [2] ALGBURI A, COMITO N, KASHTANOV D, et al. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83 (3) : e02508-e02516.
- [3] BRAUNER A, FRIDMAN O, GEFEN O, et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(5) : 320-330.
- [4] DEL POZO J L, PATEL R. Are antibiotics and surgery sufficient to treat biofilm-associated infections? [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2013, 31(10) : 641-642.
- [5] COATES A R, HU Y. Targeting non-multiplying organisms as a way to develop novel antimicrobials [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29(3) : 143-150.
- [6] CERI H, OLSON M E, STREMIC K, et al. The calgary biofilm device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37 (6) : 1771-1776.
- [7] FUX C A, COSTERTON J W, STEWART P S, et al. Survival strategies of infectious biofilms [J]. *Trends Microbiol*, 2005, 13(1) : 34-40.
- [8] DONLAN R M. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 33(8) : 1387-1392.
- [9] HØIBY N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis [J]. *BMC Med*, 2011, 9:32.
- [10] DEL POZO J L. Biofilm-related disease [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2018, 16(1) : 51-65.
- [11] SETH A K, GERINGER M R, HONG S J, et al. *In vivo* modeling of biofilm-infected wounds: A review [J]. *J Surg Res*, 2012, 178(1) : 330-338.
- [12] 夏菁, 王悦, 常静. 一种新型生物膜清洗液清洗效果的临床研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27 (18) : 4258-4260.
- [13] 张冬雪, 程成, 王蕾, 等. 乳香提取物对两种牙周致病菌体外抑菌作用的研究 [J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2017, 15(4) : 224-227.
- [14] 张雪宁, 马方芳, 郑艳秋, 等. 苦寒类中药抑菌作用及机制的现状与思考展望 [J]. *中外医学研究*, 2020, 18 (14) : 180-182.
- [15] 邓丽红, 谢臻, 麦蓝尹, 等. 蒽醌类化合物抗菌活性及其机制研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(21) : 2450-2455.
- [16] YIN Y, ZHAO C, LI H, et al. Clinical and microbiological characteristics of adults with hospital-acquired pneumonia: A 10-year prospective observational study in China [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021, 40(4) : 683-690.
- [17] 刘畅, 孙路路, 付征, 等. 基于伏邪理论的清透法对 ICU 耐药菌肺部感染患者耐药菌清除率及脱机成功率的影响 [J]. *北京中医药*, 2015, 34(2) : 108-112.
- [18] 蓝海涛, 赵昕, 孙路路, 等. 中医清透法对多重耐药大肠埃希菌腹腔感染大鼠的影响 [J]. *中国中医急症*, 2012, 21(10) : 1605-1606.
- [19] 刘畅, 李宛珊, 孙路路, 等. 新加达原散体外延缓铜绿假单胞菌耐药的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2014, 23(11) : 2017-2020.
- [20] 石岩, 左雪, 齐文升. 新加达原散抑制肺炎克雷白杆菌生物膜耐药的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2019, 28(10) : 1792-1795, 1809.
- [21] 左雪. 清散/清透方对细菌性肺炎患者体温的影响及清透方抗 *S. a* 生物膜初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [22] ROBERTS A E, KRAGH K N, BJARNSHOLT T, et al. The limitations of *in vitro* experimentation in understanding biofilms and chronic infection [J]. *J Mol Biol*, 2015, 427(23) : 3646-3661.
- [23] SØNDERHOLM M, BJARNSHOLT T, ALHEDE M, et al. The consequences of being in an infectious biofilm: Microenvironmental conditions governing antibiotic tolerance [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12) : 2688.

[责任编辑 王鑫]