

· 药理 ·

## 连花清瘟胶囊抗金黄色葡萄球菌生物膜研究

雷洪涛<sup>1</sup>, 刘敏彦<sup>2</sup>, 欧阳竞锋<sup>1</sup>, 王宏涛<sup>2</sup>, 马淑骅<sup>1</sup>, 王艺竹<sup>3</sup>, 侯燕鸣<sup>1</sup>, 王毅<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 2. 石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035;  
3. 吉林大学基础医学院, 长春 130021)

[摘要] 目的: 观察连花清瘟胶囊对成熟金黄色葡萄球菌生物膜 (*Staphylococcus aureus* biofilm, *S. a* BF) 的抑制作用。

方法: 采用 96 孔板微量稀释法检测连花清瘟胶囊和青霉素最小杀菌浓度 (MBC); 用结晶紫 (CV) 和微生物活性 (WST) 检测法观察连花清瘟胶囊和青霉素抗 *S. a* BF 的作用; 用扫描电子显微镜 (SEM) 和激光共聚焦显微镜 (CLSM) 观察药物作用后的 *S. a* BF 形态并测量厚度。结果: 连花清瘟胶囊和青霉素对 *S. a* 的 MBC 分别为  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与对照组比较, 连花清瘟胶囊显著抑制 *S. a* BF ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 青霉素差异不显著。SEM 观察到空白对照组 *S. a* BF 较厚, 细菌形态正常, 密集叠加, 大小一致; 连花清瘟胶囊组 *S. a* BF 由散在菌落组成, 大小不一致; 青霉素组 *S. a* BF 较厚, 细菌形态基本正常, 密集叠加, 大小一致, 个别细菌塌陷萎缩; CLSM 观察到空白对照组 *S. a* BF 以活菌为主体, 其间散落死菌; 连花清瘟胶囊组 *S. a* BF 有大量死菌, 和活菌相互参杂; 青霉素组 *S. a* BF 以活菌为主, 部分死菌分布在 *S. a* BF 表层。与空白对照组比较, 连花清瘟胶囊组 *S. a* BF 厚度显著降低 ( $P < 0.01$ ), 青霉素组差异不显著, 连花清瘟胶囊组 *S. a* BF 厚度显著低于青霉素组 ( $P < 0.01$ )。结论: 连花清瘟胶囊具有显著的抗 *S. a* BF 作用, 抗 *S. a* BF 评估体系可应用于传统中药抗菌作用研究。

[关键词] 连花清瘟胶囊; 青霉素; 金黄色葡萄球菌; 生物膜

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)22-0161-04

[doi] 10.11653/syfy2013220161

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130917.1609.001.html>

[网络出版时间] 2013-09-17 16:09

## Study on Lianhua Qingwen Capsule Resisting *Staphylococcus aureus* Biofilm

LEI Hong-tao<sup>1</sup>, LIU Min-yan<sup>2</sup>, OUYANG Jing-feng<sup>1</sup>, WANG Hong-tao<sup>2</sup>, MA Shu-hua<sup>1</sup>,  
WANG Yi-zhu<sup>3</sup>, HOU Yan-ming<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>1\*</sup>

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Company Limited, Shijiazhuang 050035, China;  
3. School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibition of Lianhua Qingwen capsule (LHQW) on

*Staphylococcus aureus* biofilm (*S. a* BF). **Method:** Microdilution method was used to assay minimal bactericidal concentration (MBC) of LHQW and penicillin. The crystal violet (CV) and microbial activity (WST) assay were used to evaluate the inhibition of LHQW and penicillin on *S. a* BF. The scanning electron microscopy (SEM) and laser scanning confocal microscopy (CLSM) were used for observing *S. a* BF morphology and thickness measurement. **Result:** The MBC values of LHQW and penicillin against free *S. a* were  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Compared with the control group (control), LHQW significantly inhibited *S. a* BF ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), penicillin was no significant difference; *S. a* BF of the control group showed the thicker, normal bacterial form, dense overlay and the same size under the SEM, while *S. a* BF of LHQW group showed scattered colonies,

[收稿日期] 20130401(021)

[基金项目] 国家科技重大专项“重大新药创制”(2011ZX09201-201-27); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(2010ZZ005)

[第一作者] 雷洪涛, 硕士, 助理研究员, 从事中医药抗菌作用研究工作, Tel: 010-64014411-2560, E-mail: riantian@163.com

[通讯作者] \* 王毅, 博士, 研究员, 从事中西医微生物免疫学研究工作, Tel: 010-64014411-2560, E-mail: wangyi02@gmail.com

inconsistent size, and *S. a* BF of penicillin group showed thicker, basically the same size, and the individual bacteria were collapse; *S. a* BF of control group were made of viable cells and a little dead bacteria under the CLSM, while *S. a* BF of LHQW group had a large number of dead bacteria, with which viable cells mixed; *S. a* BF of penicillin group was made of viable cells and the dead bacteria are distributed over the surface of *S. a* BF. Compared with the blank control group, *S. a* BF of LHQW group was thick significantly ( $P < 0.01$ ), penicillin had no significant difference; *Sa* BF of LHQW group was less thick significantly than the penicillin group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** LHQW has significant anti-*S. a* BF effect. Anti-*S. a* BF assessment system can be used in the antibacterial effect of traditional Chinese medicine.

[Key words] Lianhua Qingwen capsule; penicillin; *Staphylococcus aureus*; biofilm

细菌生物膜是由细菌不可逆的黏附于组织或材料表面,聚集、生长并分泌胞外基质包裹自身,形成膜状结构的细菌群落,其生存方式不同于浮游细菌,具有独特的生长调控机制和基因表型<sup>[1]</sup>。抗生素难以渗透到膜内杀灭细菌,因此对抗菌药物的敏感性下降,细菌生物膜表现出更强的耐药性<sup>[2-3]</sup>。研究表明,人类约 80% 细菌感染性疾病由细菌生物膜引起<sup>[4]</sup>。金黄色葡萄球菌是临床上感染性疾病最常见的致病菌之一,该菌常形成生物膜 (biofilm, BF) 致病,使患者发生持续性感染<sup>[5]</sup>。莲花清瘟胶囊治疗细菌性肺炎和急性上呼吸道感染取得了良好的效果<sup>[6-8]</sup>。莲花清瘟胶囊对 *S. a*、甲乙型溶血性链球菌、肺炎球菌、流感杆菌均有一定的抑制作用,但这是基于悬浮细菌进行的实验,与临床上真实的细菌致病状态有一定的差距。本研究以 *S. a* BF 为研究对象,观察莲花清瘟胶囊抗成熟生物膜的作用,以期传统抗菌中药的研究开辟新的途径。

## 1 材料

**1.1 菌株** 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, (*S. a*) ATCC 25923, 由奥地利格拉斯大学惠赠。

**1.2 药品及试剂** 莲花清瘟胶囊由连翘、金银花、炙麻黄、炒苦杏仁、石膏、板蓝根、贯众、鱼腥草、藿香、大黄、红景天、薄荷脑、甘草组成,水提醇沉,过滤形成膏粉,由石家庄以岭药业股份有限公司提供,批号 111006。含 0.5% 葡萄糖的 LB (Luria-Bertani) 培养基溶解莲花清瘟胶囊膏粉,每 1 mL 含药物成分 40 mg。注射用青霉素钠 (由华北制药股份有限公司生产,批号 X1108105), 胰蛋白胨、酵母提取物 (英国 Oxoid), 结晶紫 (美国 Amresco), 微生物活性检测试剂盒 (日本同仁化学), LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability 试剂盒 (美国 Molecular Probes); 戊二醛 (上海化学试剂公司)。

**1.3 仪器** ELx50 自动洗板机 (美国伯腾), HWS<sup>-1</sup> 50 恒温恒湿培养箱 (上海森信), iMark 酶标

仪 (美国伯乐), FV1000 激光共聚焦显微镜 (日本奥林巴斯), S-3400N 扫描电子显微镜 (日本日立)。

## 2 方法

**2.1 *S. a* 培养及 BF 模型建立** 选取单个 *S. a* 菌落接种于 LB 培养基, 37 °C 恒温振荡器培养 24 h。参考文献 [9] 方法建立 BF 模型, 用含 0.5% 葡萄糖的 LB 培养基调整 *S. a* 菌液浓度为吸光度 ( $A$ )<sub>600</sub> = 0.05, 接种于 96 孔板、24 孔板和共聚焦专用小皿 (杭州生友生物技术有限公司), 37 °C 培养 24 h, 形成成熟 *S. a* BF。

**2.2 *S. a* 最小杀菌浓度 (MBC) 检测** 参考文献 [10], 将药物和菌液共培养与 96 孔板, 莲花清瘟胶囊 (终质量浓度 40 000 ~ 20 mg·L<sup>-1</sup>) 和青霉素 (终浓度 2 ~ 0.001 mg·L<sup>-1</sup>) 分别倍比稀释 ( $n = 4$ ), *S. a* 菌液浓度为  $A_{600} = 0.05$ , 37 °C 培养 24 h。每孔取菌液, 划线法接种于 LB 固体培养基, 无细菌生长的最小浓度即为药物 MBC。

**2.3 结晶紫 (CV) 和微生物活性 (WST) 法检测 *S. a* BF 生物量** 96 孔板中成熟 *S. a* BF, 吸取培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 洗去悬浮细菌, 加入倍比稀释的莲花清瘟胶囊 (2 500 ~ 4.88 mg·L<sup>-1</sup>) 和青霉素 (20 ~ 0.04 mg·L<sup>-1</sup>), 空白对照 (control) 加入等量培养基, 37 °C 培养 24 h, 每个药物浓度 4 个复孔。参考文献 [9], CV 检测适用于测定全部生物膜, 包括活菌、死菌及胞外基质, 药物作用后, 吸去上清, 用 PBS 清洗 2 次, 洗去悬浮细菌, 每孔加入 200 μL 0.4% 的 CV 溶液, 室温下静置 10 min; PBS 缓冲液清洗 2 次, 去除未结合的 CV; 每孔加入 200 μL 99% 乙醇溶液溶解结晶紫, 置于酶标仪中读数, 波长为 590 nm。WST 检测适用于测定生物膜中活菌量; 药物作用后, 吸去上清, 每孔加入 190 μL LB 培养液, 然后加入 10 μL WST-电子载体溶液 (WST 溶液和电子载体溶液比例为 9:1), 37 °C 孵育 2 h, 置于酶标仪中读吸光度 ( $A$ ), 波长为 450 nm。

**2.4 扫描电子显微镜观察 *S. a* BF** 24孔板中成熟 *S. a* BF,吸取上清,洗去悬浮细菌,连花清瘟胶囊组(终浓度  $2\ 500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和青霉素组(终质量浓度  $2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),空白对照组加入等量培养基,  $37\ ^\circ\text{C}$  培养 24 h。样本用 PBS 清洗 2 次,洗掉悬浮细菌,2.5% 戊二醛固定,乙醇逐级脱水,真空冷冻干燥、喷金,扫描电子显微镜下拍照,观察细菌生物膜形态并测定单个细菌直径( $n=3$ )。

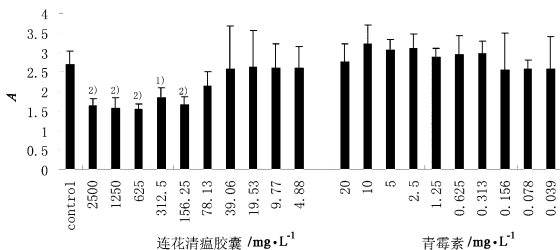
**2.5 激光共聚焦显微镜观察 *S. a* BF** 玻璃小皿中成熟 *S. a* BF,吸取上清,洗去悬浮细菌,连花清瘟胶囊组(终质量浓度  $2\ 500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和青霉素组(终质量浓度  $2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),空白对照组加入等量培养基,  $37\ ^\circ\text{C}$  培养 24 h。样本按照 LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight Bacterial Viability Kits 说明书操作,染色 15 min,激光共聚焦显微镜拍照,测量 *S. a* BF 厚度( $n=3$ )。

**2.6 统计学方法** 数据采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 *S. a* 的 MBC 测定** 连花清瘟胶囊对 *S. a* 的 MBC 为  $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,青霉素对 *S. a* 为  $2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

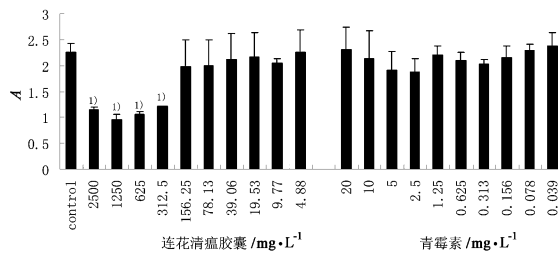
**3.2 对 *S. a* BF 的作用** 图 1 示, CV 检测,与空白对照组比较,连花清瘟胶囊( $2\ 500 \sim 156.25\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )显著减少 *S. a* BF 总的生物量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而青霉素对 *S. a* BF 作用不明显。图 2 示, WST 检测,与空白对照组比较,连花清瘟胶囊( $2\ 500 \sim 312.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )显著减少 *S. a* BF 中活菌量( $P < 0.01$ ),而青霉素对 *S. a* BF 作用不明显。



与 control 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 1 连花清瘟胶囊和青霉素对 *S. a* BF 的作用(CV 染色,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

**3.3 扫描电子显微镜观察 *S. a* BF 变化** 图 3 示,空白对照组 *S. a* BF 较厚,大量细菌密集叠加在一起,形态正常,表面光滑,大小基本一致,直径为  $670 \sim 734\ \text{nm}$ ;连花清瘟胶囊组 *S. a* BF 由散在菌落组成,形态不规则,大小不一致,直径为  $412 \sim 1\ 430\ \text{nm}$ ;青霉素组 *S. a* BF,大量细菌密集叠加在一起,形

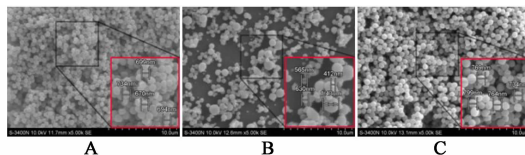


与 control 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

图 2 连花清瘟胶囊和青霉素

对 *S. a* BF 的作用(WST 染色,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

态正常,大小基本一致,直径为  $734 \sim 799\ \text{nm}$ ,个别细菌塌陷萎缩。



A. 空白对照组;B. 连花清瘟胶囊  $2\ 500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组;  
C. 青霉素  $2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组(图 4 同)

图 3 扫描电子显微镜观察 *S. a* BF 变化

**3.4 激光共聚焦显微镜观察 *S. a* BF 变化** 图 4 示,激光共聚焦显微镜观察(绿色表示活菌、红色表示死菌),空白对照组 *S. a* BF 主要以活菌为主体,其间散落死菌(或休眠细菌);连花清瘟胶囊组 *S. a* BF 厚度降低,死菌和活菌相互杂,有大量死菌存在于膜内;青霉素组 *S. a* BF 厚度未见降低,以活菌为主,部分死菌分布在细菌生物膜上层。

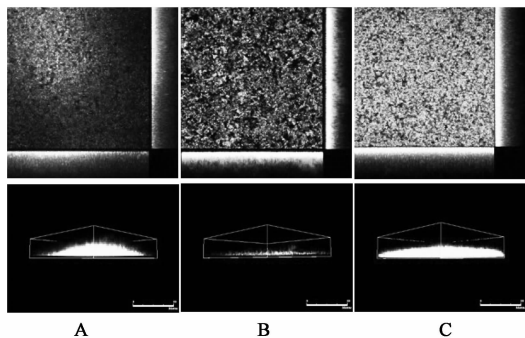


图 4 激光共聚焦显微镜观察 *S. a* BF 变化( $n=3$ )

空白对照组、连花清瘟胶囊组、青霉素组厚度分别是  $(22.20 \pm 0.84)$ ,  $(17.60 \pm 1.14)$ ,  $(21.80 \pm 1.64)\ \mu\text{m}$ 。与空白对照组比较,连花清瘟胶囊组 *S. a* BF 厚度显著降低,青霉素组差异不显著;连花清瘟胶囊组 *S. a* BF 厚度显著低于青霉素组( $P < 0.01$ )。

### 4 讨论

细菌生物膜是引起人类感染性疾病的主要原因,导致慢性持续性感染或感染反复发作,是临床上

亟待克服的难题<sup>[11]</sup>。研究发现,上呼吸道感染、难治性肺炎、亚急性感染性心内膜炎、体内人工置留物感染等,与细菌生物膜密切相关<sup>[12]</sup>。*S. a* 常以 BF 的形式致病,使患者发生慢性反复性感染<sup>[13]</sup>。莲花清瘟胶囊具有清瘟解毒、宣肺泄热作用,方中连翘、金银花清热解毒、疏散风热;配伍板蓝根、贯众、鱼腥草加强清热解毒之功,石膏、薄荷脑清热、泻火、疏风,红景天益气清肺,甘草祛痰止咳、调和药性,临床上具有显著的解热祛痰、杀菌抗病毒的作用。

本研究表明,莲花清瘟胶囊对浮游 *S. a* MBC 显著高于青霉素,但是 *S. a* 形成 BF,青霉素在 MIC 基础上提高 10 倍,不能有效清除成熟 *S. a* BF,也不杀灭 *S. a* BF 内细菌,与大多数抗生素无法通过 BF 杀灭膜内细菌<sup>[14]</sup>的研究结果相一致;而莲花清瘟胶囊(2 500 ~ 156. 25 mg·L<sup>-1</sup>) 在 MBC 以下,有效降低成熟 *S. a* BF,并且部分杀灭 *S. a* BF 的活细菌( $P < 0. 05, P < 0. 01$ ),提示莲花清瘟胶囊有效组分能够渗透或破坏 BF 屏障,抑制 *S. a* BF。

在形态学方面,扫描电子显微镜发现莲花清瘟胶囊作用后的 *S. a* BF 由散在菌落组成,形态不规则,细菌直径大小不一致;青霉素组和空白对照组, *S. a* BF 较厚,形态正常,细菌直径大小基本一致,青霉素组个别细菌有塌陷萎缩。说明莲花清瘟胶囊使细菌生物膜分散,单个细菌胀大或者缩小;青霉素不能使细菌生物膜分散,但抑制细菌细胞壁的合成,可见个别细菌塌陷,两者作用机制不同。激光共聚焦显微镜发现莲花清瘟胶囊作用后的 *S. a* BF,死菌和活菌相互杂染,有大量死菌存在于膜内;青霉素组 *S. a* BF 以活菌为主,部分死菌分布在膜上层,说明莲花清瘟胶囊的有效组分穿过 BF 作用于膜内活菌,而青霉素不能穿过 BF。与空白对照组比较,莲花清瘟胶囊组 *S. a* BF 厚度显著降低( $P < 0. 01$ ),更进一步证实了莲花清瘟胶囊的抗 *S. a* BF 作用。莲花清瘟胶囊具有抗 *S. a* BF 活性,可减低 *S. a* BF 厚度,其机制可能是药物活性成分发挥多靶点效应,一方面分解 *S. a* BF 基质破坏 BF 保护屏障,一方面穿透 BF 杀灭膜内细菌,这可能正是临床上莲花清瘟胶囊临床上治疗上呼吸道感染取得良好效果的原因,但对于莲花清瘟胶囊抗 BF 机制尚需进一步研究。

本研究结果提示以杀灭浮游细菌为标准的药物抗菌活性试验,无法有效评估莲花清瘟胶囊和抗菌中药的抗菌活性,也无法解释其临床表现的优越性;应以抑制 BF 作为评价中药抗菌活性的标准。同

时,本研究所应用的评估体系可用于传统中药抗菌作用研究,为抗菌中药研究开辟了新方法。

### [参考文献]

- [1] Cos P, Toté K, Horemans T, et al. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(20): 2279.
- [2] Jackson D W, Suzuki K, Oakford L, et al. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(1): 290.
- [3] Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(10): 1466.
- [4] National Institutes of Health. Research on microbial biofilms [R]. Bethesda: NIH, 2002.
- [5] Smith K, Perez A, Ramage G, et al. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt8): 1018.
- [6] 刘春援, 李晓强, 蔡绍乾. 莲花清瘟胶囊的药理与临床研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2010, 26(6): 21, 84.
- [7] 张金龙, 谭亚萍. 莲花清瘟胶囊治疗肺部感染 30 例疗效观察 [J]. *世界中医药*, 2010, 5(3): 158.
- [8] 王以炳, 谢艳丽, 杨玉梅, 等. 莲花清瘟胶囊治疗呼吸道感染的疗效与安全性研究 [J]. *疑难病杂志*, 2008, 7(1): 24.
- [9] Wang Y, Wang T, Hu J, et al. Anti-biofilm activity of Tanreqing, a traditional Chinese medicine used for the treatment of acute pneumonia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(1): 165.
- [10] Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans* [J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 2): 353.
- [11] Cvitkovitch D G, Li Y H, Ellen R P. Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(11): 1626.
- [12] Kong K F, Vuong C, Otto M. Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection [J]. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296(2/3): 133.
- [13] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318.
- [14] Hadaway L C. Skin flora: unwanted dead or alive [J]. *Nursing*, 2005, 35(7): 20.

[责任编辑 聂淑琴]