

黄连解毒汤抗铜绿假单胞菌生物被膜 及与阿奇霉素协同抗菌作用

朱小明, 杨家卿, 张昌峰, 程惠娟*
(安徽中医学院, 合肥 230038)

[摘要] **目的:**研究黄连解毒汤抗铜绿假单胞菌生物被膜及与阿奇霉素协同抗菌作用。**方法:**微量倍比稀释法测定黄连解毒汤对铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度(MIC),棋盘稀释法测定黄连解毒汤和阿奇霉素协同抗菌作用,MTT法测定黄连解毒汤对铜绿假单胞菌生物被膜的最小抑膜浓度(SMIC),显微镜下观察药物对生物膜形态的影响。**结果:**黄连解毒汤对铜绿假单胞菌的MIC $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,阿奇霉素 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,两药联合后MIC分别为 $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 抑菌分级指数(FIC)0.1875,提示两药协同作用明显。黄连解毒汤对铜绿假单胞菌生物被膜的SMIC₅₀ 1,3 d均为 $15.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,7 d $31.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;SMIC₈₀ 1,3,7 d均为 $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,形态观察提示黄连解毒汤SMIC₈₀浓度对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制作用明显。**结论:**黄连解毒汤具有抗铜绿假单胞菌生物被膜作用,与阿奇霉素有协同抗菌作用。

[关键词] 铜绿假单胞菌;生物被膜;黄连解毒汤;协同抗菌

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0155-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.020 **[网络出版时间]** 2012-03-27 17:07

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1707.020.html>

The *in vitro* Effects of Huanglian Jiedu Decoction against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and its Synergism with Azithromycin on Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*

ZHU Xiao-ming, YANG Jia-qin, ZHANG Chang-feng, CHENG Hui-juan*
(Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Huanglian Jiedu decoction against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and its synergistic antibacterial in combination with azithromycin. **Method:** The microdilution assay was used to detect MIC of Huanglian Jiedu decoction against *P. aeruginosa*, checkerboard method was used to examine synergism of Huanglian Jiedu decoction and azithromycin. MTT assay was used to detect SMIC of Huanglian Jiedu decoction against *P. aeruginosa* biofilms, and microscopes was used to observe morphology of biofilms treated with the two drugs. **Result:** MIC of Huanglian Jiedu decoction against *P. aeruginosa* was $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and azithromycin $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. After the combination of two-drug MIC was $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fractional inhibitory concentration (FIC) 0.1875, which showed a synergism with azithromycin. SMIC₅₀ of Huanglian Jiedu Decoction against *P. aeruginosa* biofilms at 1, 3, 7 d was 15.6 , 15.6 , $31.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; SMIC₈₀ of the biofilms was 250 , 250 , $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Morphologically Huanglian Jiedu decoction inhibited *P. aeruginosa* biofilms evidently at the concentration of SMIC₈₀. **Conclusion:** Huanglian Jiedu decoction could inhibit *P. aeruginosa* biofilms, and has a synergism with azithromycin.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; biofilms; Huanglian Jiedu decoction; synergistic antibacterial

[收稿日期] 20111222(007)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173629)

[第一作者] 朱小明,本科在读,从事中药抗感然与免疫研究,Tel:15956932205

[通讯作者] *程惠娟,副教授,硕士生导师,从事中药抗感然与免疫研究,E-mail chenghuijuan53@sina.com

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)为条件致病菌,是医院内感染的主要病原菌之一,对化学药物的抵抗力比一般革兰氏阴性菌强大,有些菌株对磺胺、链霉素、氯霉素敏感,但极易产生耐药性。铜绿假单胞菌的耐药机制异常复杂,其中生物被膜(biofilm, BF)的形成是产生耐药机制的重要因素之一,使其对抗生素和宿主免疫系统具有很强的抵抗力^[1-2],从而导致严重的临床问题,引起许多慢性 and 难治性感染疾病的反复发作。黄连解毒汤源于《外台秘要》为清热解毒代表方剂。现代常用本方治疗细菌感染性疾病所致的高热、烦渴等症^[3]。近又有报道黄连解毒汤能够改善由于缺血损伤导致的炎症^[4],而该方对铜绿假单胞菌生物被膜的作用还未见报道,因此,本课题选取黄连解毒汤探究其对抗铜绿假单胞菌生物被膜与阿奇霉素的抗菌协同作用,为临床治疗提供依据。

1 材料

1.1 药物 黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子组成,比例为 3:2:2:3,经过煎煮制成。生药由安徽中医学院第一附属医院中药房提供(本院制剂室鉴定),常规方法水煎制备 1 000 g·L⁻¹的 100% 黄连解毒汤煎剂。用无菌滤纸过滤,装瓶备用,阿奇霉素(石药集团欧意药业有限公司)。

1.2 菌株 铜绿假单胞菌(标准株 ATCC27853),由安徽中医学院第一附属医院细菌室提供。

1.3 培养基 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)(北京奥博星生物技术有限责任公司 02—034),营养琼脂(青岛高科园海博生物技术有限公司 HB0109)。

1.4 试剂 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液(PBS),甲基四氮唑蓝试剂(MTT)(Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO)(天津市光复精细化工研究所,分析纯)。

1.5 检测仪器 318-酶标仪(上海三科仪器有限公司),96 孔平板(杭州生友生物技术有限公司),DPH-9162 型电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司),CX21 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),扫描电镜(Sirion200,美国 FEI 公司),TU-1901 双光束紫外-可见光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 菌液 将实验菌株接种于 TSB 培养基中,于 37 ℃ 摇床增菌 6 h,将菌液置于离心机中 2 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃去上清液,加入生理盐水再离心 10 min 弃去上清液,加入生理盐水紫外分光光度计 A_{570 nm} 调制 A = 0.1 的菌悬液备用。

2.2 测定黄连解毒汤、阿奇霉素对铜绿假单胞菌的 MIC 黄连解毒汤用胰蛋白胨大豆肉汤稀释成 10 个浓度梯度:200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 g·L⁻¹,阿奇霉素用胰蛋白胨大豆肉汤稀释成 10 个浓度梯度:200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 mg·L⁻¹。上述各浓度的药物分别加入 24 孔板中每孔 2 mL。同时设置阴性对照孔(未加中药只含培养基)每药物孔中加入上述菌液,每孔 100 μL。37 ℃ 培养 24 h 后,以无菌生长的最小药物稀释度为 MIC。

2.3 测定黄连解毒汤和阿奇霉素的协同抗菌作用 黄连解毒汤和阿奇霉素分别用胰蛋白胨大豆肉汤稀释成 5 个浓度梯度:2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 MIC。用棋盘稀释法向两个 24 孔板中加入药物,每孔 100 μL。各药物孔中加入上述菌液,每孔 100 μL。37 ℃ 培养 24 h,观察结果,计算抑菌浓度指数(FIC)。

2.4 测定黄连解毒汤、阿奇霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的 SMIC 黄连解毒汤用胰蛋白胨大豆肉汤稀释药物成 10 个浓度梯度 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 g·L⁻¹,阿奇霉素稀释成 500, 250, 125, 62.5, 31.26, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 mg·L⁻¹。取 6 套 96 孔板,3 套为实验组,3 套为对照组分别注明 1, 3, 7 d 检测。将各浓度黄连解毒汤加入 96 孔板 1~10 列,每孔 200 μL,每浓度 8 个复孔。再加入调整至约 0.1 A 的菌液,每孔 10 μL。第 11 列加不含药的培养基和菌液作为阴性对照,12 列加培养基作空白对照。37 ℃ 培养 1, 3, 7 d。(每隔 2 d 换 1 次药)MTT 法检测抑制生物被膜 50% (SMIC₅₀)及 80% (SMIC₈₀)的药物浓度:向 96 孔板中加入现配的 MTT 溶液,每孔 50 μL。37 ℃ 培养 5 h 后,弃去含 MTT 的培养基。PBS 洗 3 遍,加入 DMSO,每孔 100 μL。振荡 5 min,在酶标仪 492 nm 波长下检测吸光度(A)。同样的方法测定阿奇霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的 SMIC₅₀ 和 SMIC₈₀。

2.5 黄连解毒汤对铜绿假单胞菌生物膜形成影响的形态观测 黄连解毒汤用胰蛋白胨大豆肉汤调至相应 SMIC₈₀ 浓度,加 20 mL 于无菌培养皿中,加入调整至 A 约 0.1 的铜绿假单胞菌菌液 500 μL 混匀。放入已经灭菌的盖玻片 8 片作为载体。另取 1 个无菌培养皿,加入 20 mL TSB 液体培养基,加入 500 μL 菌液,放入已经灭菌的盖玻片 8 片,作为菌体对照。培养 1, 3 d 取两张盖玻片银染光学显微镜下观

察菌体形态,7 d取3张盖玻片银染光学显微镜观察,另取7 d 1片镀银染色,扫描电镜下观察菌体形态。

2.6 数据统计 数据应用SPSS 11.0软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 黄连解毒汤、阿奇霉素单独用药和联合用药对铜绿假单胞菌的MIC 见表1。

表1 黄连解毒汤、阿奇霉素对铜绿假单胞菌的MIC

药物	协同前 MIC	协同后 MIC
黄连解毒汤/ $g \cdot L^{-1}$	100	25
阿奇霉素/ $mg \cdot L^{-1}$	200	25

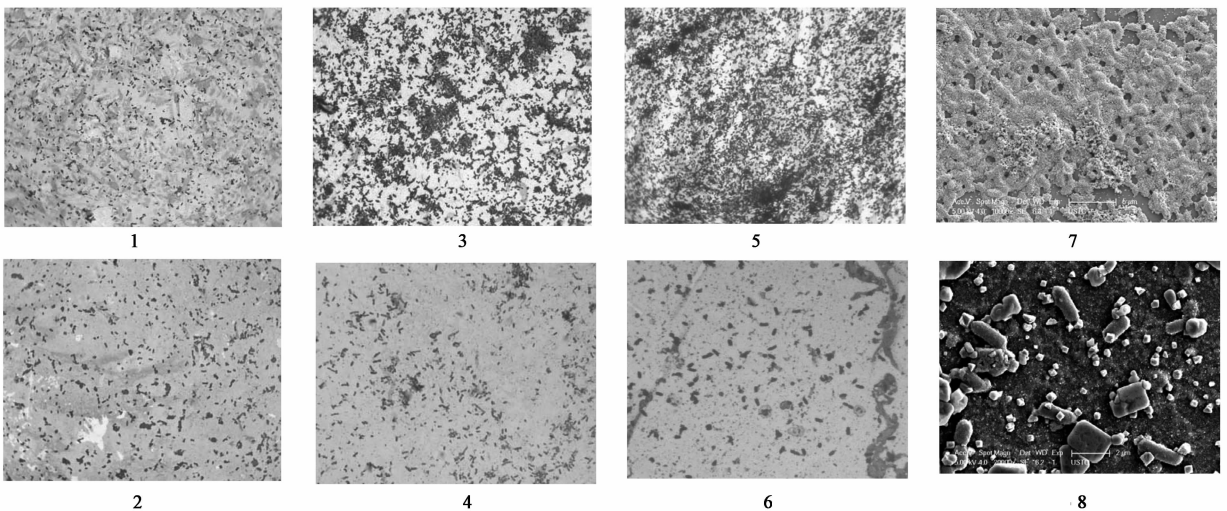
根据表1中的结果计算分级抑菌浓度指数(FIC)为0.1875,表明黄连解毒汤和阿奇霉素具有协同抗铜绿假单胞菌作用,(两药联合使用,当 $FIC < 0.5$ 时,表示二者有协同作用)。

3.2 黄连解毒汤、阿奇霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制(SMIC) 各时间段的 $SMIC_{80}$, $SMIC_{50}$ A和阴性对照组比较差异显著, $P < 0.01$ 。见表2。

表2 黄连解毒汤、阿奇霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的SMIC

作用时间 /d	指标	黄连解毒汤 / $g \cdot L^{-1}$	阿奇霉素 / $mg \cdot L^{-1}$
1	$SMIC_{50}$	15.6	15.6
	$SMIC_{80}$	250	31.25
3	$SMIC_{50}$	15.6	31.25
	$SMIC_{80}$	250	62.5
7	$SMIC_{50}$	31.25	62.5
	$SMIC_{80}$	250	125

3.3 黄连解毒汤抗生物被膜形态观察 光学显微镜和扫描电镜下观察黄连解毒汤抗生物被膜结果:铜绿假单胞菌培养1 d后,细菌周围明显出现黏液质(图1,1),而加过药的细菌清晰可见(图1,2)。铜绿假单胞菌培养3 d后,细菌黏液质增多形态更模糊(图1,3),因每两天换药,图1,4中细菌仍旧清晰。图1,7中铜绿假单胞菌体外培养7 d细菌被生物被膜覆盖,交织成片、形态模糊。图1,8中细菌在黄连解毒汤作用7 d后,生物被膜没有形成,菌体形态清楚,菌数减少,表明黄连解毒汤确有抗生物被膜作用,图片中还能看到一些中药的结晶体。



1,3,5,7. 铜绿假单胞菌分别培养1,3,5,7 d;2,4,6,8加入黄连解毒汤250 $g \cdot L^{-1}$ 作用于铜绿假单胞菌1,3,5,7 d

图1 黄连解毒汤抗生物被膜形态观察(扫描电镜, $\times 10\ 000$)

4 讨论

细菌对抗生素的耐药性是临床治疗感染性疾病最棘手的问题,因感染死亡的人数逐年增加,因此迫切需要寻找新的抗菌制剂。

细菌的耐药性产生的原因之一是产生生物被膜,细菌生物被膜已成为全球关注的重大难题,如何防

治细菌生物膜及其相关危害,日益成为目前研究的前沿和热点^[5],生物被膜的发育循环一般要经过菌细胞黏附、微菌落形成、微菌落融合、生物膜成熟、菌细胞从生物膜中释放出来等5个阶段^[6]。基此,本实验根据细菌生物膜形成的时间段来观察黄连解毒汤对细菌生物被膜的影响。

有报道^[7],阿奇霉素体外对细菌生物被膜具有较好的抑制作用,故本实验采用做为对照,证实实验方法正确有效。实验采用标准菌株为实验菌株,SMIC 测定中使用 MTT 法,MTT 法可间接反映活的菌细胞数量,由于生物被膜是由附着于载体上的活菌产生的,当载体上的细菌减少时,生物被膜也随之减少。因此 SMIC 用来评价抑膜浓度^[8]。本实验观察黄连解毒汤抑制铜绿假单胞菌 SMIC₈₀ SMIC₅₀,以其在抑制生物被膜 80% 和 50% 时,能解除生物被膜生物屏障作用,有利于抗生素的治疗和免疫因素的杀菌。黄连解毒汤在 SMIC₈₀ 的浓度 250 g·L⁻¹ 时对铜绿假单胞菌生物被膜形成有明显的影 响,显微镜下观察也提示该药对铜绿假单胞菌生物被膜的发育有明显的干预作用。以上研究表明,黄连解毒汤可抑制铜绿假单胞菌生物被膜的形成,对铜绿假单胞菌生物被膜的代谢及形态均有影响;随着药物浓度的增加,对铜绿假单胞菌生物被膜形成的抑制作用有增强趋势。

实验还显示该药与阿奇霉素有很好的抗菌协同作用,这为临床中西医结合治疗感染性疾病提供了依据。

中药中的清热解毒方剂大都具有抗菌抗病毒的作用,对细菌有着明显的抑制作用,使用中毒副作用小,不易产生耐药性等优点,中药的抗生物被膜作用也逐渐引起重视,有报道苦参碱对慢性铜绿假单胞菌生物膜肺部感染有保护作用^[9],经典方剂在临床应用中有着很好的疗效,研究经典方剂新的药效机制对发扬光大中医药事业也是一条很好的途径。

[参考文献]

- [1] Philippon A, Arlet G, Jacoby G A. Plasmid determined ampc-type β -lactamases [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(1): 111.
- [2] ZHENG L X, CHEN G, LUO Z Y, et al. Risk factors of nosoco-mial pneumonia and resistance pattern [J]. Chin J Nosoco-nmiol, 2003, 13(5): 427.
- [3] 赵保胜,刘永刚,王秀丽. 黄连解毒汤解热、抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 55.
- [4] 钱智磊,李欢,朱华旭,等. 黄连解毒汤中指标性成分药动学与药效学相关性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 122.
- [5] 段高飞,韩峰,李京宝,等. 细菌生物膜相关感染的防治方法研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(5): 107.
- [6] KAR IN SAUER, CAMPER A K, EHRL ICH G D, et al. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm [J]. J Bacteriol, 2002, 184(4): 1140.
- [7] 徐莉莉,张杰,杜小玲,等. 阿奇霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制作用[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(8): 1187.
- [8] Barbara Fiori, Brunella Posteraro, Riccardo Torelli, et al. *in vitro* activities of anidulafungin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different candida and aspergillus species antimicrob [J]. Agents Chemother, 2011, 55(6): 3031.
- [9] 郭向华,郭润华,宋志军,等. 苦参碱对慢性铜绿假单胞菌生物膜肺部感染大鼠的免疫保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 185.

[责任编辑 聂淑琴]