

· 药理 ·

痰热清注射液与亚胺培南西司他丁联合对广泛耐药铜绿假单胞菌的抑菌作用

邢亚君¹, 杨伟峰¹, 孙娅楠¹, 马淑骅¹, 姜童童², 贺改英¹, 张小利³, 王毅^{1*}

(1. 中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700; 2. 吉林农业大学, 长春 130118;
3. 上海凯宝药业股份有限公司, 上海 201401)

[摘要] 目的: 观察痰热清注射液(痰热清)与亚胺培南西司他丁联合对广泛耐药铜绿假单胞菌的抑菌作用, 并研究其作用机制, 为临床治疗耐药菌提供参考。方法: 将医院临床分离到广泛耐药铜绿假单胞菌采用微量稀释法检测痰热清与亚胺培南西司他丁最小抑菌浓度(MIC); 棋盘法检测联合用药抑菌效果; 微孔板法检测对成熟生物膜内细菌代谢活性的影响; BioFlux 动态观察药物对生物膜的影响并用激光共聚焦扫描显微镜观察活死细菌的分布; 扫描电子显微镜(SEM)观察药物作用后细菌的形态变化。结果: 亚胺培南西司他丁和痰热清的 MIC 分别为 $512 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $>16\ 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。棋盘法结果显示痰热清可增强亚胺培南西司他丁的敏感性, 二者协同抑菌, 并确定联合用药浓度。与空白组或单用亚胺培南西司他丁组比较, 联合用药各组显著减少生物膜内活菌量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。BioFlux 结果表明与空白组或单用药物组比较, 联合用药各组可破坏生物膜结构, 减小生物膜面积($P < 0.05$); 荧光染色结果显示联合用药对动态生物膜内细菌的代谢活性有明显抑制。SEM 显示痰热清可抑制细菌分裂。结论: 痰热清与亚胺培南西司他丁联合对浮游和生物膜状态的细菌生长有抑制作用, 还可对生物膜产生破坏作用。

[关键词] 痰热清; 亚胺培南西司他丁; 铜绿假单胞菌; 协同效应; 生物膜; 浮游菌

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0060-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191107

Effect of Tanreqing Injection Combined with Imipenem-cilastatin in Inhibiting Extensively-drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

XING Ya-jun¹, YANG Wei-feng¹, SUN Ya-nan¹, MA Shu-hua¹, JIANG Tong-tong²,
HE Gai-ying¹, ZHANG Xiao-li³, WANG Yi^{1*}

(1. *Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*;
2. *Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China*;
3. *Shanghai Kaibao Pharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 201401, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of combination of Tanreqing injection (Tanreqing) and imipenem-cilastatin on extensively-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (XDPA), and study the mechanism of the combination. **Method:** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of Tanreqing and imipenem-cilastatin against planktonic XDPA strain isolated in clinic were determined by the broth microdilution method. The checkerboard method was used to evaluate the combination effect. The bacterial metabolic activity in mature biofilm was studied by microtiter-plate test. The destructive effect of combination drugs on dynamic biofilm was observed by

[收稿日期] 20181107(016)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373884); 财政部基本科研业务经费(Y201701, ZZ0808011, ZZ2014004, ZZ2016011); 国家自然科学基金青年基金项目(81603285); 北京市自然科学基金项目(7132157); 上海凯宝药业院士工作站项目(HX2017001)

[第一作者] 邢亚君, 在读硕士, 从事中西医微生物免疫学研究, Tel: 010-64019507, E-mail: yajunxing@outlook.com

[通信作者] * 王毅, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中西医微生物免疫学研究, Tel: 010-64019508, E-mail: wangyi02@tsinghua.org.cn

using BioFlux system, and viable cells were examined by confocal laser scanning microscope (CLSM) after treatment. The scanning electron microscopy (SEM) was used for observing *Pseudomonas aeruginosa* and length measurement. **Result:** The MIC values of imipenem-cilastatin and Tanreqing were $512 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and more than $16\ 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The checkerboard analysis showed that Tanreqing could enhance the sensitivity of imipenem-cilastatin, while the combination drugs synergistically inhibited the growth of bacteria. Compared with the control group or the imipenem-cilastatin individual group, the combined drugs significantly reduced the amount of living bacteria in the biofilm ($P < 0.05$, $P < 0.01$). BioFlux results showed that the combination drugs destructed the biofilm structure and reduced the area coverage ($P < 0.05$) by comparing with the control group or the single drug group. The results of fluorescent staining showed that the combination drug significantly inhibited the metabolic activity of bacteria in dynamic biofilm. Tanreqing inhibited bacterial division to achieve the antibacterial effect. **Conclusion:** Tanreqing and imipenem-cilastatin synergistically inhibit the bacterial growth in planktonic and biofilm states, and destruct biofilms.

[Key words] Tanreqing; imipenem-cilastatin; *Pseudomonas aeruginosa*; synergistic effect; biofilm; planktonic bacteria

广泛耐药的铜绿假单胞菌 (extensively-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, XDPA) 是指除对 1~2 类抗菌药物 (主要指多粘菌素和替加环素) 外, 几乎对所有类别抗菌药物不敏感的菌株。XDPA 显著增加了患者的发病率、病死率和住院时长, 是临床抗感染治疗的棘手问题, 给公共卫生带来巨大挑战。铜绿假单胞菌通过形成生物膜, 外排泵, 细胞膜修饰, 改变药物靶点, 降解抗生素等方式产生对多种抗生素的耐药性^[1]。生物膜是细菌生命的主要形式, 细菌黏附于接触表面, 分泌胞外多糖、蛋白质和核苷酸等物质, 并将自身包被于大量胞外多聚物中。而生物膜的形成可以帮助细菌逃避机体先天性免疫和适应性免疫系统, 减缓抗生素扩散, 提高细菌突变率, 显著提高细菌对抗生素的抗性^[2]。

亚胺培南西司他丁 (IPM) 是高效广谱的非典型 β -内酰胺类抗菌药物, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、厌氧菌引起的呼吸道感染、腹腔内感染和败血症等均有较好治疗效果, 曾被认为是治疗耐药革兰氏阴性菌的最后一道防线。随着该类药物在临床上的广泛应用, 铜绿假单胞菌的碳青霉烯耐药性逐年增高。相较于 IPM 敏感菌株, 产生耐药的铜绿假单胞菌引起的感染临床表现无特征性, 但治疗困难, 预后更差^[3]。痰热清注射液 (Tanreqing, TRQ) 是黄芩片、熊胆粉、山羊角、金银花、连翘组成的中药复方制剂, 黄芩为君药, 上清肺火, 下泻膀胱火; 熊胆粉和山羊角为臣药, 解痉、解毒、抑菌抗炎、祛痰镇咳平喘; 金银花和连翘为佐使药, 以助清热解毒、清热宣透。TRQ 用于风温肺热病痰热阻肺证, 对支气管感染和肺部感染有显著疗效, 对慢性阻塞性肺疾病急性加重期

有治疗作用。临床有二者联合治疗耐药性铜绿假单胞菌肺部感染的报道, 但对相关机制的研究还不明确^[4-5]。本研究以广泛耐药铜绿假单胞菌为研究对象, 观察 TRQ 与 IPM 联合用药对浮游菌和生物膜的作用, 为临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 菌株 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 临床菌株 XDPA 由北京中医药大学东直门医院分离, 来源于痰标本, 对阿米卡星、氨曲南、头孢吡肟、头孢他啶、环丙沙星、庆大霉素、亚胺培南、左氧氟沙星、美罗培南、哌拉西林他唑巴坦均产生耐药。质控菌株为铜绿假单胞菌 PAO1。

1.2 药物与试剂 TRQ (上海凯宝药业有限公司, 批号 1704117); IPM (美国默沙东公司, 批号 M048385); XTT 钠盐, 吩嗪硫酸甲酯 (PMS) (美国 Sigma 公司, 批号分别为 SLBK1057V, BCBM8136V); 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC, 美国 Amresco 公司, 批号为 0765); 细菌细胞活性测定试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 批号为 1813798); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (北京索莱宝科技有限公司, 批号 409L024); 胰蛋白胨, 酵母提取物 (英国 Oxoid 公司, 批号分别为 1863590, 1390139-02); 氯化钠 (国药集团化学试剂北京有限公司, 批号为 20180509); LB 培养基 (胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 超纯水配制)。

1.3 仪器 THZ-D 型恒温振荡器 (北京佳源兴业科技有限公司); KMF240 型恒温恒湿箱 (德国 Binder 公司); BIO II Advance 型生物安全柜 (西班牙 Telstar 公司); ELX50 型全自动八道洗板机 (美国

Bio-Tek 公司); iMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); MLS-3750 型分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); FV1000 型共聚焦激光扫描显微镜(日本 Olympus 公司); BioFlux 200 型数控剪切流活细胞自动分析平台, 910-0004 BioFlux WPM 48 Well Plates 型数控剪切流活细胞自动分析平台专用平板(美国 Fluxion 公司)。

2 方法

2.1 最小抑菌浓度(MIC)检测 从 XDPA 和 PAO1 平板中分别挑取单菌落置于 3 mL LB 培养基中, 37 °C, 280 r·min⁻¹ 培养 16 h, 600 nm 处测定吸光度 A_{600} 。LB 培养基稀释菌液至 $A_{600} = 0.02$, 采用标准微量肉汤稀释法分别测定 XDPA, PAO1 对 TRQ, IPM 的 MIC 值。取无菌 96 孔板, 按照倍比稀释法稀释药液, 其中 TRQ 的浓度梯度为 1/2 ~ 1/256 原液(1 L TRQ 溶液的恒质量约为 33 000 mg^[6]), XDPA 菌株 IPM 浓度范围为 2 048 ~ 16 mg·L⁻¹, PAO1 菌株 IPM 浓度范围为 32 ~ 0.25 mg·L⁻¹, 每孔 100 μL, 再加入菌液 100 μL 使菌液终浓度 $A_{600} = 0.01$ 。37 °C 培养 24 h。后每孔加入 0.25% TTC 20 μL, 继续培养 30 min, 有菌生长呈现红色, 即为药物的 MIC 值。

2.2 微量棋盘稀释法^[7]测定 TRQ 与 IPM 联合的抗菌效果 取 96 孔板以棋盘法的方式对联用药物分别进行倍比稀释。IPM 1 024 ~ 32 mg·L⁻¹ 的浓度分别与 TRQ 1/4 ~ 1/128 (8 250 ~ 257.8 mg·L⁻¹) 进行联合, 体积为 100 μL。之后加入菌液 100 μL, 使菌液终浓度 $A_{600} = 0.01$, 37 °C 培养 24 h。每孔加入 0.25% TTC 20 μL, 继续培养 30 min。记录实验结果。将各联合组的最小抑菌浓度绘制于等效图中, 连接各点, 呈现“凹”线, 可认为其为协同作用; 直线为相加性作用; 凸线为拮抗作用^[8]。筛选最佳联合用药浓度, 用于之后实验。

2.3 微孔板法检测药物对 PA 细菌生物膜的影响

根据本实验室之前的方法进行检测^[6], 96 孔板中每孔加入 XDPA 菌液 ($A_{600} = 0.02$) 100 μL, 37 °C 培养 24 h。根据 2.2 项下筛选出的浓度, 加入药液, 37 °C 继续培养 24 h。用 0.9% 氯化钠洗板 2 次, 去除孔中的浮游细菌, 加入 XTT-PMS 200 μL 培养 2 h, 酶标仪在 450 nm 检测微孔板中的活菌量。

2.4 药物对微流控剪切力作用下 PA 细菌生物膜的影响

2.4.1 数控剪切流活细胞工作站观察药物对生物膜的影响 参考 Benoit 等^[9] 实验条件在数控剪切流活细胞自动分析平台专用平板上培养 XDPA, 加

入 LB 培养基 200 μL, 给予剪切力 5 dyn·cm⁻², 5 min, 以排出管道内气体; 弃去废液。入口加入培养基 100 μL, 出口接入菌液 ($A_{600} = 0.1$) 100 μL; 出口至入口方向给予剪切力 2 dyn·cm⁻², 5 s, 镜下观察窗内布满细菌, 静置 1 h, 弃去废液。加入 LB 培养基 1 mL, 给予 0.8 dyn·cm⁻² 剪切力, 培养 30 h, 每 15 h 换新鲜培养基。生物膜成熟后, 加入含药培养基 1 mL, 继续给予剪切力 0.8 dyn·cm⁻²。根据 2.2 项下结果, 设置药物浓度。给药后每小时拍照 1 次, 实时观察药物对成熟细菌生物膜作用。使用 BioFlux 对给药后与给药前生物膜面积的比值进行统计分析。

2.4.2 激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)观察生物膜内活死菌分布 参考 Live/Dead 试剂盒说明书的配制方法, SYTO9 与 PI 按照 1:1 混合, 每毫升 PBS 中加入染料混合物 3 μL。在 2.4 项观察结束时, 加入新鲜配制的染料 200 μL, 并在 0.8 dyn·cm⁻² 剪切力下进行染色; 20 min 后使用 CLSM 观察, 拍摄生物膜的照片, 观察生物膜内活死菌的变化。

2.5 细菌形态学观察 将 XDPA, PAO1 菌液 ($A_{600} = 0.02$) 加入盛有载玻片的 24 孔板中, XDPA 菌株空白组加入 LB 培养基, TRQ 组, IPM 组和联合用药组浓度分别为 1/16 原液, 64 mg·L⁻¹, 64 mg·L⁻¹ IPM + 1/16 TRQ; PAO1 菌株空白组加入 LB 培养基, TRQ 组和 IPM 组浓度分别为 1/16 原液和 1 mg·L⁻¹。菌液终浓度 $A_{600} = 0.01$, 37 °C 培养 24 h。取出载玻片, 4% 戊二醛固定, 乙醇梯度脱水, 叔丁醇浸透处理样品。真空冷冻干燥后, 固定于导电金属样品台上, 喷金镀膜, 放于扫描电子显微镜(SEM)下观察^[10]。

2.6 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 GraphPad Prism 7 软件进行单因素方差分析, 方差齐者采用 LSD 进行两两比较, 方差不齐者进行 Dunnett's T3 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 图像使用 Image J 软件进行处理。

3 结果

3.1 IPM, TRQ 对 PA 的 MIC 值的影响 IPM 对 XDPA, PAO1 菌株的 MIC 值分别为 512, 1 mg·L⁻¹。TRQ 对两株 PA 的 MIC 值均未能检出, 可认为其 MIC > 1/2 原液(即 > 16 500 mg·L⁻¹)。以此为依据确定微量棋盘法浓度。

3.2 TRQ 与 IPM 联合抗菌作用效果 在联合用药后, TRQ 的 MIC 值无明显变化; IPM 对 XDPA 的 MIC 值由 512 mg·L⁻¹ 降低至 64 mg·L⁻¹, 此时 TRQ 的联合

浓度最低可致 1/32 原液浓度。等效线图绘制时,由于 TRQ 的 MIC > 1/2 原液,故暂用 1/2 原液浓度代替 MIC_{TRQ}。将各联合组使用到的最小浓度绘制于图中,连接各点,发现其呈现“凹”线,可认为其为协同作用,见图 1。将结果中,IPM 64, 32 mg·L⁻¹ 分别与 TRQ 1/16, 1/32 原液浓度的联合用于之后实验。

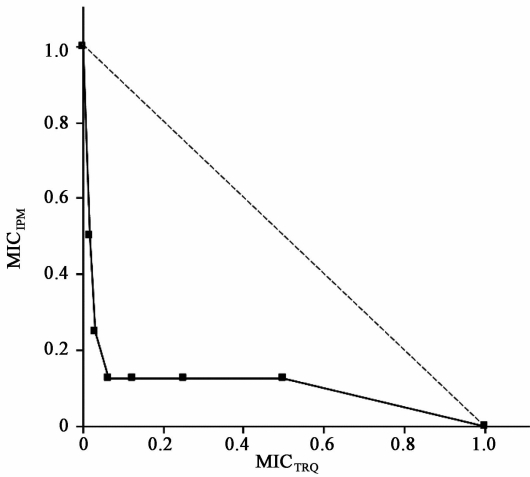


图 1 TRQ 与 IPM 联合作用等效线
Fig.1 Isobologram of TRQ combined with IPM for inhibition of XDPA cell growth

3.3 IPM, TRQ 对 XDPA 生物膜内活菌量的影响

与空白组比较, IPM 64 mg·L⁻¹, TRQ 组以及联合用药组可明显减少生物膜活菌量 ($P < 0.01$), IPM 32 mg·L⁻¹ 对活菌量的抑制 ($P < 0.05$)。随 IPM 浓度减小, 抑制作用减弱, TRQ 1/16 和 1/32 原液浓度对生物膜的作用无明显差异。与单用相同浓度的 IPM 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 TRQ 比较, 除 TRQ 1/32 + IPM 32 mg·L⁻¹ 外, 联合用药组活菌量均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.4 药物对 PA 动态细菌生物膜的影响

3.4.1 BioFlux 观测药物对剪切力下动态生物膜的影响

与空白组比较, IPM 64, 32 mg·L⁻¹ 对细菌解聚解黏附作用不明显, 其生物膜面积和光密度均有明显增大。而 TRQ 1/16, 1/32 则可以观察群落出现松散迹象, 膜面积和光密度减小。在 IPM 与 TRQ 联合用药时, 与空白组或者单用 IPM 组比较, 其他联用组(除 IPM 32 mg·L⁻¹ + TRQ 1/16 外)均可观察到生物膜松散, 膜面积变小 ($P < 0.05$), 聚集和黏附能力下降的现象。说明 TRQ 和联合用药可以破坏生物膜完整结构, 而 IPM 无此作用。见图 2 和表 2。

3.4.2 Live/Dead 染色观察药物对生物膜中活死菌的分布

空白组绿色荧光信号值强, 表明活菌生命

表 1 XTT 法检测 IPM 与 TRQ 联合用药对 XDPA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of IPM combined with TRQ on mature biofilm of XDPA by XTT ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	A ₄₅₀
空白	-	0.35 ± 0.02
IPM	64	0.28 ± 0.01 ¹⁾
	32	0.31 ± 0.02 ²⁾
TRQ	2 063	0.24 ± 0.01 ¹⁾
	515.6	0.25 ± 0.02 ¹⁾
IPM + TRQ	64 + 2 063	0.20 ± 0.03 ^{1,3,5)}
	32 + 2 063	0.21 ± 0.02 ^{1,4,5)}
IPM + TRQ	64 + 515.6	0.22 ± 0.02 ^{1,3,6)}
	32 + 515.6	0.24 ± 0.02 ^{1,4)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; 与 64 mg·L⁻¹ IPM 组比较³⁾ $P < 0.01$; 与 32 mg·L⁻¹ IPM 组比较⁴⁾ $P < 0.01$; 与 1/16 TRQ 组比较⁵⁾ $P < 0.05$; 与同 1/32 TRQ 组比较⁶⁾ $P < 0.05$ 。

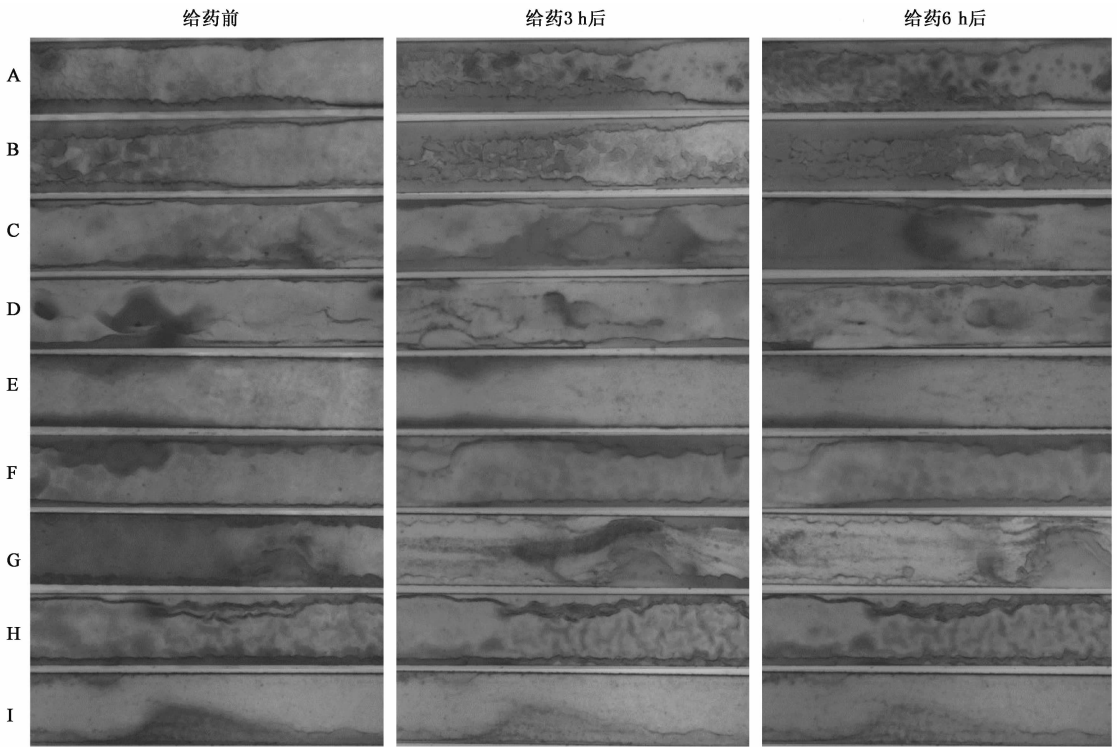
力旺盛。IPM 在 64 mg·L⁻¹ 时, 可观测到生物膜及膜外浮游菌染色多呈现红色, 细菌代谢能力弱, 为死菌; 在 32 mg·L⁻¹ 时, 管道内的浮游菌多为死菌, 生物膜呈现为活菌, 可能与药物浓度较低, 较难渗透杀菌有关。与空白组比较, TRQ 1/16 原液浓度生物膜内多为死菌; 1/32 原液浓度管道中可观察到代谢活性较强的浮游菌。联合用药组的管道内生物膜均呈现红色荧光信号, 浮游菌与生物膜内的细菌代谢活性均较弱, 为死菌。见图 3。

3.5 扫描电镜观察药物对铜绿假单胞菌的形态变化

XDPA 各组菌体, 呈球状, 表面光滑。与空白组比较, IPM 处理组的细菌, 部分胞壁出现破损, 分裂期长度无明显差异; TRQ 处理组的细菌, 长度明显大于空白组和 IPM 组; 联合用药组形态与 TRQ 组相似, 与空白组和 IPM 组比较, 未分裂菌体长度与分裂期细菌长度均明显增长。标准菌株 PAO1 各组菌体, 形态正常, 表面光滑。与空白组比较, IPM 组细菌长短不一, 胞壁略有破损, 分裂期长度略有增长; 经 TRQ 处理的细菌, 长短不一, 菌体长度明显增长, 可达空白组和 IPM 组数倍。见图 4。

4 讨论

IPM 是过去十年多重耐药 (MDR) 铜绿假单胞菌的经验用药, 但过度使用使铜绿假单胞菌的分离率在逐年递减的背景下, 碳青霉烯敏感率仍未超过 70%^[11-13]。XDPA 的出现使临床面临无药可用的难题, 引起医院获得性肺炎、菌血症等相关感染所致病死率大大提高。广泛耐药菌株多为克隆传播, 易引起医院感染暴发流行。



A. 空白组; B. IPM 64 mg·L⁻¹组; C. IPM 32 mg·L⁻¹组; D. TRQ 1/16 组; E. TRQ 1/32 组; F. IPM 64 mg·L⁻¹ + TRQ 1/16 组; G. IPM 64 mg·L⁻¹ + TRQ 1/32 组; H. IPM 32 mg·L⁻¹ + TRQ 1/16 组; I. IPM 32 mg·L⁻¹ + TRQ 1/32 组(图 3 同)

图 2 BioFlux 观察 IPM 与 TRQ 联合用药对 XDPA 的影响

Fig. 2 Effect of IPM combined with TRQ on dynamic biofilm of XDPA by BioFlux

表 2 BioFlux 分析 IPM 与 TRQ 联合用药对 XDPA 生物膜面积变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	给药 3 h 后	给药 6 h 后	%
空白	-	124.5 ± 7.6	150.8 ± 23.6 ¹⁾	
IPM	64	124.6 ± 19.9	157.6 ± 20.4 ¹⁾	
	32	160.6 ± 22.6 ¹⁾	239.7 ± 53.0 ¹⁾	
TRQ	2 063	71.6 ± 11.1	64.2 ± 14.8 ¹⁾	
	515.6	80.3 ± 8.6	70.1 ± 7.6	
IPM + TRQ	64 + 2 063	54.9 ± 18.4 ^{1,2)}	44.7 ± 17.6 ^{1,2)}	
	32 + 2 063	84.5 ± 7.9 ³⁾	81.6 ± 5.2 ³⁾	
IPM + TRQ	64 + 515.6	65.1 ± 14.4 ^{1,2)}	49.1 ± 22.4 ^{1,2)}	
	32 + 515.6	65.2 ± 19.5 ^{1,3)}	54.4 ± 13.8 ^{1,3)}	

注: 给药前的生物膜面积均为 100.0%; 与给药前组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与给药相同时间的 64 mg·L⁻¹ IPM 比较²⁾ $P < 0.05$; 与给药相同时间的 32 mg·L⁻¹ IPM 比较³⁾ $P < 0.05$ 。

中药在我国已经有几千年的应用历史, 可以作用于抗菌的多个环节, 防止耐药性的产生。耐药铜绿假单胞菌感染症状多为咳嗽、黏痰、发热, 中医证候类型多为痰热壅肺证^[14-15]。TRQ 具有清热化痰、解毒利胆的功效, 在临床上多用于呼吸道感染性疾病, 疗效显著^[16-17]。笔者前期的工作基础表明 TRQ 对金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA) 的浮游菌和生物膜均有显著的抑制

作用^[6-7, 18]。

本研究表明, TRQ 对浮游状态的细菌并无明显的抑制作用, 微孔板法难以检测其 MIC 值。但 IPM 与 TRQ 联合用药时, 最小抑菌浓度降低至 1/8, 即 64 mg·L⁻¹, 而此浓度与输注 1 g 该药物的人体平均血药浓度相当; 即使与 1/128 原液浓度 TRQ 联合, 也可将其 MIC 降低至 1/2。笔者推测 TRQ 可以增强 XDPA 对 IPM 的敏感性。

与浮游细菌比较,生物膜的形成是铜绿假单胞菌耐药的一个非常重要的途径,可以阻止外界抗菌物质进入,帮助细菌逃避宿主免疫反应,增强对抗菌剂的耐受能力^[19]。黄芩片、鱼腥草、大黄、栀子、穿心莲等中药已被证实对铜绿假单胞菌及生物膜有抑制作用^[20-21]。笔者将浮游菌状态筛选出的联合药物浓度用于之后的生物膜实验中。在静态成熟生物膜中,二者协同起效对细菌的代谢活性产生抑制作用,且明显优于单用抗生素。在动态生物膜实验中,TRQ 组与联合用药组对成熟生物膜有解聚解黏附的作用,同时对生物膜中细菌的代谢活性有明显降低。结合静态与动态生物膜数据,笔者得出 TRQ 可以协同 IPM 渗透进入生物膜,对膜内细菌进行杀灭。由于生物膜状态下,TRQ 对细菌展现出优于抗生素的抑菌效果,笔者推测 TRQ 不只是增敏剂,该药可抑制 XDPA 生物膜生长。

为了对联合作用的抗菌机制及 TRQ 是否只是增敏剂进行进一步研究,笔者使用扫描电子显微镜进行观察。IPM 的杀菌作用是由于其具有抑制细胞壁合成的能力。而细胞壁的合成是细菌分裂的重要

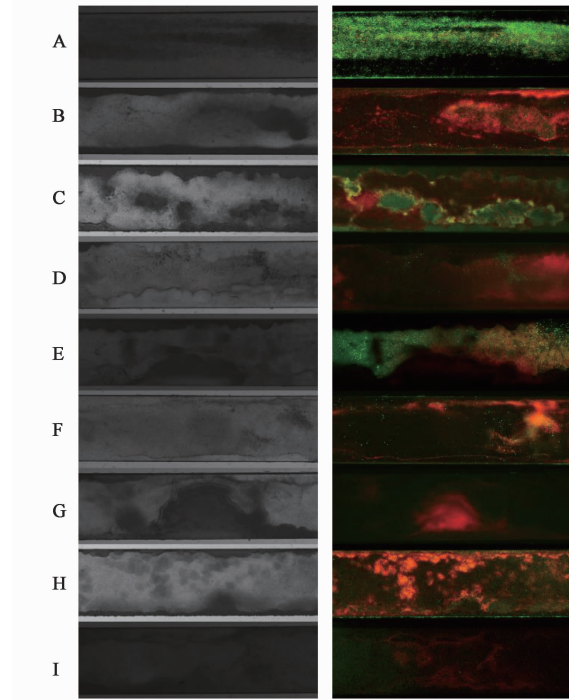
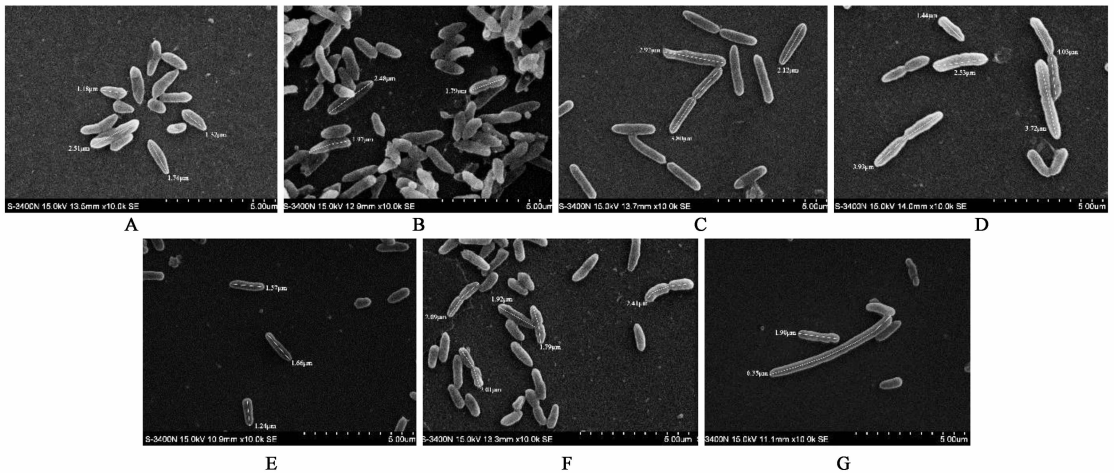


图 3 CLSM 观察 IPM 与 TRQ 联合用药对 XDPA 的影响
Fig.3 Effect of IPM combined with TRQ on dynamic biofilm of XDPA by CLSM



A. 空白组; B. IPM 64 mg·L⁻¹组; C. TRQ 1/16 组; D. IPM 64 mg·L⁻¹ + TRQ 1/16 组标准菌株 PAO1; E. 空白组; F. IPM 1 mg·L⁻¹组; G. TRQ 1/16 组

图 4 扫描电镜观察 IPM 与 TRQ 对 PA 的影响(×10 000)
Fig.4 Effect of IPM and TRQ on PA by SEM(×10 000)

环节,笔者发现 TRQ 和联合用药对 XDPA 细菌分裂有较好的抑制作用,且明显优于 IPM。在标准菌株 PAO1 上,TRQ 的分裂抑制能力同样得到验证。笔者由此推测,TRQ 具有抑制 PA 的能力,同时二者联合时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。

综上所述,TRQ 与 IPM 联合用药,增强细菌对抗生素敏感性,对细菌分裂产生抑制,杀灭细菌。在

生物膜的形成和聚集时,TRQ 可破坏其完整性,协同抗生素渗透进入生物膜,对膜内细菌代谢产生抑制。该研究为临床用药提供实验数据,其作用机制仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] Lister P D, Wolter D J, Hanson N D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance

- mechanisms[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(4): 582-610.
- [2] Lebeaux D, Ghigo J M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014, 78(3): 510-543.
- [3] 袁莉莉, 丁百兴, 沈震, 等. 碳青霉烯类抗生素耐药铜绿假单胞菌感染的临床研究[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(2): 121-126.
- [4] 施卫荣, 周建英. 痰热清注射液联合亚胺培南治疗高龄耐药性铜绿假单胞菌肺部感染患者的临床疗效[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 25(10): 103-106.
- [5] 孙广信, 常瑞, 李珊, 等. 痰热清注射液治疗下呼吸道多药耐药铜绿假单胞菌感染临床研究[J]. *中医学报*, 2012, 27(10): 1348-1349.
- [6] WANG Y, WANG T, HU J 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): 165-170.
- [7] YANG W F, LIU J L, Blažeković B, et al. *In vitro* antibacterial effects of Tanreqing injection combined with vancomycin or linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 169.
- [8] ZHU W, ZHANG Y H, Sinko W, et al. Antibacterial drug leads targeting isoprenoid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(1): 123-128.
- [9] Benoit M R, Conant C G, Ionescu-Zanetti C, et al. New device for high-throughput viability screening of flow biofilms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4136-4142.
- [10] 雷洪涛, 刘敏彦, 欧阳竞锋, 等. 莲花清瘟胶囊抗金黄色葡萄球菌生物膜研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(22): 161-164.
- [11] Kalil A C, Metersky M L, Klompas M, et al. Executive summary: management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America and the American thoracic society [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(5): 575-582.
- [12] 张祎博, 孙景勇, 倪语星, 等. 2005—2014年CHINET铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(2): 141-145.
- [13] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017年CHINET中国细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2018, 18(3): 241-251.
- [14] 任英莉, 孟宪卿, 王珊珊, 等. 耐药铜绿假单胞菌肺炎中医证型演变规律研究[J]. *内蒙古中医药*, 2016, 35(12): 5-6.
- [15] 徐丽丽. 难治性风温肺热病中医证候学规律研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [16] 宋志香, 李刘坤, 李兴广. 中药痰热清注射液治疗MRSA感染性肺炎的临床观察研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(11): 1596-1598.
- [17] 龙爽, 刘绍勇, 徐英. 痰热清注射液及5种中间体对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(11): 73-80.
- [18] 刘珏玲, 杨伟峰, 孙娅楠等. 痰热清注射液对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜三维结构的影响[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(12): 1152-1156.
- [19] 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.
- [20] 黄梅, 谭余庆, 罗俊, 等. 植物类中药抗细菌耐药性的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(23): 218-224.
- [21] 周至品, 杨兴秀, 叶晓雪. 传统药物对铜绿假单胞菌生物被膜作用研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6): 230-235.

[责任编辑 周冰冰]