



穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜作用初探

官妍^{1*}, 章九云¹, 汪长中¹, 王宁¹, 刘志芳¹, 石晶金²

(1. 安徽中医学院, 安徽合肥 230038; 2. 蚌埠医学院, 安徽蚌埠 233030)

[摘要] **目的:**通过穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜抑制作用的研究,为表皮葡萄球菌生物被膜菌引起的相关感染提供新的治疗途径。**方法:**体外构建表皮葡萄球菌生物被膜,以红霉素作为阳性对照药,利用XTT减低法评价穿心莲内酯对表皮葡萄球菌初始黏附及生物被膜内细菌代谢的影响,显微镜下观察该药对表皮葡萄球菌生物被膜的形态学影响,刚果红培养基法检测穿心莲内酯对PIA(polysaccharide interc-ellular adhesion,胞间多糖黏附素)形成的影响。**结果:**穿心莲内酯1 000, 100, 10 mg·L⁻¹对表皮葡萄球菌的黏附均有抑制作用,质量浓度大于31.25 mg·L⁻¹对生物被膜内细菌代谢有明显抑制作用,质量浓度为250 mg·L⁻¹时对表皮葡萄球菌生物被膜的形态有显著影响,质量浓度为10 mg·L⁻¹时对PIA的形成无影响。**结论:**穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜的形成有显著抑制作用,但效果不及红霉素。

[关键词] 穿心莲内酯;表皮葡萄球菌;生物被膜

细菌生物被膜(bacterial biofilm, BBF)是附着于惰性或活性实体表面的细菌以及由细菌分泌的含水聚合性基质组成的结构性细菌群落。随着各种生物材料的应用,凝固酶阴性的葡萄球菌(CNS)——表皮葡萄球菌已成为静脉导管或其他医疗装置相感染的主要病原菌^[1]。生物被膜(biofilm, BF)是条件致病菌表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, SE)的主要致病因素,表皮葡萄球菌作为存在于健康人皮肤表面的正常菌群并不致病,但可伴随“异物”(高分子材料如塑料等)进入人体,并通过黏附形成BBF,入侵血液而致败血症。以往研究已证实有生物被膜的细菌不仅耐抗生素,出现多重耐药,还可耐抗体的杀菌作用,危害性严重。本文以表皮葡萄球菌生物被膜为研究对象,从生物被膜及表皮葡萄球菌的生物学特征出发,探讨中药有效成分对表皮葡萄球菌生物被膜的作用,旨在通过在体外建立SE-BF(表皮葡萄球菌生物被膜模型),观察穿心莲内酯对SE-BF可能的抑制作用,以期在中药治疗表皮葡萄球菌引起的相关感染提供研究的依据。

1 材料

1.1 菌株 安徽医科大学第一附属医院检验科2009年4月至11月临床分离得到的45株表皮葡萄球菌,通过刚果红平板法筛选出16株PIA(polysac-

charide interc-ellular adhesion,胞间多糖黏附素)阳性菌株,从这16株中选出一株强产膜(结晶紫法测膜生长量)Se738做为实验菌株;对照菌株为*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228(生物被膜表型和PIA表型均为阴性),购于中国药品生物制品检定所。

1.2 药物与试剂 穿心莲内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号110797-200307);红霉素标准品(中国食品药品检定研究院,批号130307-200716);二甲基亚砷(天津市光复精细化工研究所,批号20100115);PBS(武汉博士德生物工程有限公司,批号AR0030);XTT(BIO BASIC INC);VK₃(美国Alexis公司);结晶紫(天津市光复精细化工研究所)。营养琼脂(青岛高科园海博生物技术有限公司,批号20100125);胰蛋白胨大豆肉汤培养基TSB(北京奥博星生物技术有限公司,批号20100312);刚果红琼脂平板(刚果红0.8 g·L⁻¹,牛脑心浸粉37 g·L⁻¹,葡萄糖5 g·L⁻¹,琼脂20 g·L⁻¹,氯化钠40 g·L⁻¹,自配)。

1.3 仪器 3DHP-9162型电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);96孔微量培养板(Corning公司);318-酶标仪(上海三科仪器有限公司);光学显微镜(Olympus公司);Sirion200型扫描电镜(FEI公司)。

2 方法

2.1 筛选实验菌株 参照文献方法并进行改良^[2],将临床分离得到的45株临床表皮葡萄球菌和标准株ATCC 12228转种到血琼脂平板(BAP)上,选择BAP上分离的单个菌落接种于刚果红培养基,

[稿件编号] 20110922013

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2010A214)

[通信作者] *官妍,副教授,E-mail:guanyan0726@sina.com



经 37 °C 培养 24 h 后,再在室温放置 24 h,筛选出菌落变为黑色带晶体且生长很好的 PIA 阳性菌株 16 株。再通过结晶紫染色法测被膜生物量,选出与 *S. epidermidis* ATCC 12228 (不产膜株)有显著差别 ($P < 0.001$) 的 Se. 738 为实验菌株。

2.2 药物对表皮葡萄球菌生物被膜菌代谢影响 参照文献并改进^[3],将 100 μL 的 0.5 Mc (麦氏单位)菌液接种入 96 孔板中,37 °C 培养 24 h,PBS 清洗 3 次,弃去培养基及悬浮菌,对倍稀释(1 000, 500,250,125,62.5,31.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)加入穿心莲内酯(每个浓度设 8 个复孔),37 °C 继续培养 48 h,加入 XTT 溶液(林格液稀释为 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,0.22 μm 孔径的滤膜过滤除菌,临用前加入 VK_3)100 μL ,37 °C 避光培养 2 h,650 nm 波长处检测各孔吸光度 A 。另设空白对照孔(只加培养基)、阴性对照孔(未加药的生物被膜生长对照)和阳性对照(对倍稀释加入红霉素)。

2.3 药物抗表皮葡萄球菌黏附作用的测定 参照文献将 100 μL 的 0.5Mc 菌液接种入 96 孔板中^[4],37 °C 分别培养 0,1,2,4 h,PBS 清洗 3 次,弃去培养基与悬浮菌,加入 10 倍连续稀释(1 000,100,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的穿心莲内酯(每个浓度设 8 个复孔),37 °C 培养 24 h 后,加入 XTT 溶液(林格液稀释为 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,0.22 μm 孔径的滤膜过滤除菌,临用前加入 VK_3)100 μL ,37 °C 避光培养 2 h;检测 650 nm 波长处吸光度 A 。另设空白对照孔(只加培养基)、阴性对照孔(未加药的生物被膜生长对照)和阳性对照(10 倍连续稀释加入红霉素)。

2.4 药物对表皮葡萄球菌生物被膜作用的形态学观察 参照文献方法^[5]将预先灭菌的盖玻片(作为黏附载体)浸在含有 0.5Mc 表皮葡萄球菌 Se. 738 菌液的培养皿中,培养 3 d(每天换 1 次菌液),再分别以穿心莲内酯 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、红霉素 125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为给药浓度,对其作用 3 d(每天换 1 次药液),镀银染色法^[6]进行电镜观察,观察药物对表皮葡萄球菌细胞被膜形态的影响。

2.5 药物对表皮葡萄球菌生物被膜形成过程中 PIA 作用的观察 参照文献方法^[7]将 Se. 738 和 ATCC 12228 分别接种到血平板上,在 37 °C 恒温箱中培养 24 h 后,选择血平板上分离的 Se. 738 单个菌落分别转种到含穿心莲内酯 10,100,1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;红霉素 10,100,1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及不含药的刚

果红平板上,选择血平板上分离的 ATCC 12228 单个菌落接种到不含药的刚果红培养基上,分别以 Se. 738 不含药刚果红培养基和 ATCC 12228 不含药刚果红培养基作为阳性对照和阴性对照,观察 Se. 738 在含药刚果红培养基的实验结果。

2.6 数据处理 采用 SPSS 11.0 软件对相关数据进行统计分析。

3 结果

3.1 药物对表皮葡萄球菌生物被膜菌代谢的影响 与未加药对照孔相比,穿心莲内酯随浓度递增,其对表皮葡萄球菌生物被膜菌的抑制作用呈增强趋势(与阴性对照相比,31.25,62.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 $P < 0.05$;125,250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 $P < 0.01$;500,1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 $P < 0.001$)。阳性对照红霉素在 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时就完全抑制了膜内菌代谢,且经过统计学数据处理得到红霉素所有浓度 A 与阴性对照相比均有显著差异 ($P < 0.001$),见图 1。

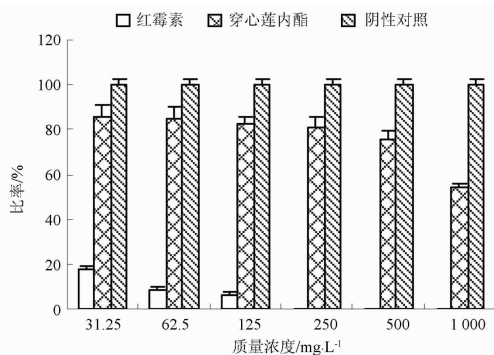


图 1 不同浓度红霉素和穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜菌代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of erythromycin and andrographolide at different concentrations on *Staphylococcus epidermidis* bacterial metabolism within biofilm ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 药物对表皮葡萄球菌黏附能力的影响 与未加药对照孔相比,穿心莲内酯 1 000,100,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对表皮葡萄球菌的黏附均有抑制作用。1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯,对 1 h 内的表皮葡萄球菌细胞黏附有抑制作用(经过统计学处理得到穿心莲内酯所有浓度 A 与阴性对照相比有显著差异 $P < 0.001$);100,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯对 2 h 内的表皮葡萄球菌细胞黏附均有显著差异 ($P < 0.001$),见图 2。阳性对照红霉素在 1 000,100,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对

表皮葡萄球菌的早期黏附均有抑制作用(与不加药的阴性对照相比 $P < 0.01$),见图 3。

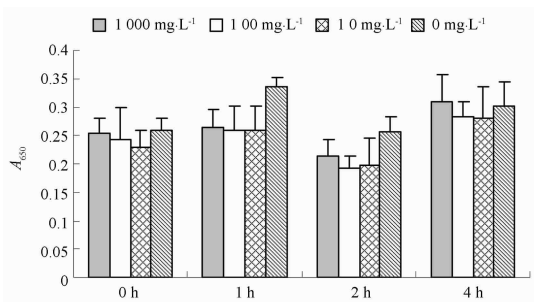


图 2 不同浓度穿心莲内酯对表皮葡萄球菌黏附性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of andrographolide at different concentrations on adherent *Staphylococcus epidermidis* cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

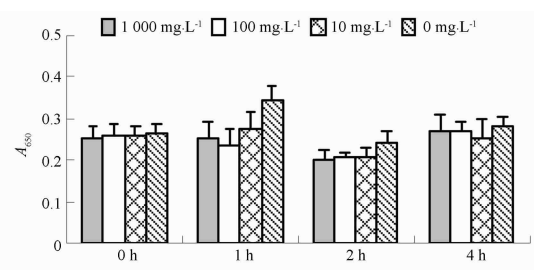


图 3 不同浓度红霉素对表皮葡萄球菌黏附性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

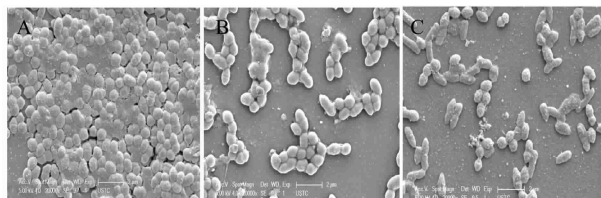
Fig. 3 Effect of erythromycin at different concentrations on adherent *Staphylococcus epidermidis* cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 药物对表皮葡萄球菌生物被膜形态学影响

通过电镜下观察培养了 3 d 的表皮葡萄球菌生物被膜模型,证实生物被膜的形成。经过穿心莲内酯作用的生物被膜,与阴性对照组相比,3 d 时对生物被膜的破坏明显,证实其对生物被膜的形成有抑制作用。阳性对照组红霉素作用 3 d 时密集的生物被膜被显著破坏,只存在一些生物被膜被分解后的分散细菌(图 4)。

3.4 药物对表皮葡萄球菌生物被膜形成过程中 PIA 的影响

产膜株 Se. 738 及不产膜标准株 ATCC 12228 在不含药刚果红培养基上菌落颜色分别为黑色(PIA 阳性)和红色(PIA 阴性),Se. 738 在含穿心莲内酯 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和含红霉素 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的刚果红培养基上菌落颜色均为黑色,即 PIA 均为阳性。该结果表明在质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时穿心莲内



A. TSB 培养 3 d 的表皮葡萄球菌(对照);B. $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯作用培养 3 d 的表皮葡萄球菌;C. $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 红霉素作用培养 3 d 的表皮葡萄球菌。

图 4 镀银染色观察 Se738 不同作用条件下的生长状况 ($\times 20\,000$)

Fig. 4 Growth of Se738 strain under different conditions observed by silver staining ($\times 20\,000$)

酯、红霉素对 PIA 的形成均无影响;在 $100, 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的穿心莲内酯和红霉素的刚果红含药培养基上 Se. 738 均不生长(穿心莲内酯 $\text{MIC} < 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 红霉素 $\text{MIC} < 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4 讨论

表皮葡萄球菌生物被膜的形成是个动态过程,主要分为 2 个阶段:首先是由细菌表面疏水性蛋白或多糖黏附素对生物材料的初始附着,形成细菌群落;随后细菌主要通过多糖胞间黏附素(PIA)介导,相互聚集,形成细菌生物被膜^[8]。SE 的初始附着阶段,需要很多因子参与,如 SE 膜多糖黏附素(cPS-PA)、自溶素(atlE)、纤维蛋白原结合蛋白(Fbe)和葡萄球菌表面蛋白(Ssp)等。在细菌生物被膜形成的聚集阶段,需要 PIA、血凝素(hemagglutinin)和聚集相关蛋白(Aap)等因子参与。其中,PIA 是细菌生物被膜形成聚集阶段所必需的物质^[9]。

鉴于生物被膜可引起慢性难治性感染以及对常规抗菌药物易产生耐药性,因此如何积极有效地控制生物被膜的形成具有重要意义。目前国内外抗生物被膜治疗主要侧重于不断研发新的抗菌西药,但应用于临床的抗生素和化学合成药物具有一定的毒副作用,生物被膜菌对这些常规药物容易产生耐药性,耐药菌株有不断增加的趋势。我国具有丰富的中药资源,中药在防治慢性感染中显示了独特的优势,中药及有效成分在抗细菌生物被膜研究、应用等方面有广阔的应用前景^[10]。

穿心莲内酯在水相中的溶解度非常低,在油相中的溶解度较高,属于脂溶性很强的药物^[11],本实验使用少量二甲基亚砜作为助溶剂,以提高穿心莲内酯在培养基中的溶解度,保证实验的准确。目前



对表皮葡萄球菌的生物被膜作用的研究主要集中在西药方面(如红霉素),故本实验选择红霉素作为阳性对照药以证实实验方法的可靠。

初步研究表明,质量浓度大于 $31.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜内细菌的代谢确有影响,而且浓度越大对生物被膜菌代谢的抑制作用越强;这个结果与大多数药物产生抑制作用的趋势相同。在黏附方面, $1\,000, 100, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的穿心莲内酯对表皮葡萄球菌早期黏附均有较为明显的抑制作用。在质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜形成的关键因素 PIA 无影响,说明在该浓度时穿心莲内酯不是通过影响 PIA,而是通过影响生物被膜形成过程中其他环节对表皮葡萄球菌生物被膜形成产生抑制作用的。形态结构方面,在质量浓度为 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜有显著的破坏作用。以上结果都证明了穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜的形成有显著抑制作用。

[参考文献]

[1] 张良,黄云超. 表皮葡萄球菌生物膜形成与生物材料感染[J]. 生物医学工程与临床,2006,10(3):194.

[2] 吴晓燕,陈劲松,倪侃翔. 表皮葡萄球菌生物膜形成对实验室检测及耐药性的影响[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(6):1112.

[3] 叶应妩,李健斋,王玉琛. 临床实验诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:1840.

[4] 官妍,谢萌,汪长中,等. 连翘苷和黄芩苷对表皮葡萄球菌生物膜抑制作用的研究[J]. 中国微生态学杂志,2010,22(10):886.

[5] 佟金平,王镇山,王燕. 镀银法观察表皮葡萄球菌生物膜[J]. 大连医科大学学报,2009,31(5):548.

[6] 王涛,王晶,郭立军. 一种钩端螺旋体标本片染色的改良方法[J]. 大理学院学报,2005,4(3):29.

[7] 官妍,徐元宏,汪长中,等. 临床分离的表皮葡萄球菌产膜株检出方法及耐药性比较[J]. 中国微生态学杂志,2010,22(7):626.

[8] 李燕,李冬冬,陶传敏,等. 表皮葡萄球菌生物膜形成及相关基因的检测及评价[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(4):473.

[9] 叶联华,黄云超,李高峰,等. 生物材料植入后发生感染与表皮葡萄球菌生物膜[J]. 生物医学工程与临床,2010,14(1):79.

[10] 汪长中. 中药抗细菌生物膜研究进展[J]. 中国中药杂志,2010,35(4):521.

[11] 陈伶俐,王振华. 穿心莲内酯基本理化性质考察[J]. 今日药学,2010,20(1):41.

Preliminary study of effects of andrographolide on *Staphylococcus epidermidis* biofilms

GUAN Yan^{1*}, ZHANG Jiuyun¹, WANG Changzhong¹, WANG Ning¹, LIU Zhifang¹, SHI Jingjin²
(1. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China;
2. Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a new therapeutic approach for *Staphylococcus epidermidis* biofilm-associated infections by the study of inhibitory effect of andrographolide (AG) on *S. epidermidis* biofilm. **Method:** *S. epidermidis* biofilms were set up *in vitro*, erythromycin was acted as the positive control agent, XTT reduction assay was used to evaluate AG on the initial adhesion of *S. epidermidis* and bacterial metabolism within biofilm, microscope was applied to observe biofilm morphology, and Congo red assay was used to detect polysaccharide intercellular adhesion (PIA) formation when exposed to AG. **Result:** AG showed inhibitory effects against the initial adhesion of *S. epidermidis* at concentrations of $1\,000, 100, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, and inhibited metabolism of biofilm bacteria at the concentration of $31.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and exhibited significantly inhibition against the biofilm morphology at the concentration of $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, while did not display inhibition against PIA formation at the concentration of $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** AG could remarkably inhibit biofilm formation of *S. epidermidis*, although it was less potent than erythromycin.

[Key words] andrographolide; *Staphylococcus epidermidis*; biofilms

doi:10.4268/cjcm20121425

[责任编辑 张宁宁]