

• 检验技术与方法 •

五倍子与阿奇霉素协同对金黄色葡萄球菌生物被膜的体外抗菌作用

穆海霞, 陈俊清[△]

(湖北省孝感市中心医院检验科 432000)

摘要:目的 观察五倍子与阿奇霉素协同对金黄色葡萄球菌生物被膜的影响。方法 平板培养法制备细菌生物被膜, 银染法初步鉴定生物被膜和测定生物被膜的黏附性, 分别在生物被膜形成的不同时间单独或联合加入 1/4 最低抑菌浓度的阿奇霉素和不同浓度的五倍子, 菌落计数法计数加药后生物被膜内细菌数, 并与不加药物所形成的生物被膜作比较。结果 五倍子的浓度在大于或等于 0.25 mg/mL 时, 对浮游的金黄色葡萄球菌有杀菌、抑菌的作用, 但对金黄色葡萄球菌生物被膜作用不明显; 但与 1/4 最低抑菌浓度的阿奇霉素联合作用后可显著减少细菌的黏附性, 减少培养液和被膜中存活菌数。结论 五倍子对金黄色葡萄球菌具有很强的杀菌、抑菌作用, 但对生物被膜作用不明显; 阿奇霉素可减少细菌的黏附, 预防或抑制细菌生物被膜的形成; 五倍子与阿奇霉素联合用药可增强对金黄色葡萄球菌生物被膜的杀菌作用。

关键词: 葡萄球菌, 金黄色; 生物膜; 五倍子; 阿奇霉素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.044

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0093-02

细菌在不利的环境中会形成细菌生物被膜, 细菌通过黏附、生长、成熟这一动态过程生长繁殖, 使菌体间相互粘连, 并将自身包埋其中形成膜状物。生物被膜阻碍或延缓抗生素通透, 常使疾病迁延不愈或出现急性发作, 给临床治疗带来很大困难。金黄色葡萄球菌形成的生物被膜是导致慢性骨髓炎、肌骨间感染、体内植入材料生物被膜等疾病的常见原因。在中药中, 五倍子具有明确的抑菌或杀菌作用, 但对细菌生物被膜影响的相关报道却不多见^[1]。本实验通过平板法构建金黄色葡萄球菌生物被膜体外模型, 探讨不同浓度五倍子与阿奇霉素组合的抗菌效果, 为临床用药提供参考, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 五倍子(黑龙江宝岛制药有限公司), 阿奇霉素(AZT, 辽宁天龙制药有限公司); 金黄色葡萄球菌 25 株, 均经天地人生物科技有限公司提供的 TDR-2000 细菌鉴定分析仪检测, 阿奇霉素均耐药。其菌株来源为本院临床血液、脓液、呼吸道标本; M-H 肉汤, 胰酶大豆肉汤。

1.2 仪器及试剂 医用硅胶膜(北京医用硅胶研究所), 超声振荡清洗机(北京医疗仪器厂)、扫描电镜 SEM(Jem-1200ex 型)、普通光学显微镜, 比浊仪; MTT 试剂, 硝酸银, 氯化钙, 对苯二酚, 硫代硫酸钠, 结晶紫。

1.3 方法 (1)五倍子提取液的制备: 准确称取五倍子 100 g, 加水适量, 煎煮 30 min, 滤过, 再将药渣加水适量煎煮 30 min, 滤过, 合并 2 次药液, 浓缩成 200 mL 煎液(为 50% 五倍子煎液), 备用。所得提取液在 115 °C 高压蒸汽灭菌后, 将提取液 100 mL 37 °C 温箱中烘干, 称重为 16 000 mg, 其实际药物含量为 160 mg/mL。(2)抗生素最低抑菌浓度测定: 以微量稀释法测定阿奇霉素和五倍子对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度(MBC)^[2]。药液稀释^[1]: 排列无菌试管 10 支, 于 2~10 支管中加无菌蒸馏水 10 mL, 取 50%(1:2)五倍子水煎液 20 mL, 第 1 管、第 2 管分别加入 10 mL, 于第 2 管混合后取出 10 mL, 加入第 3 管, 再混合后取 10 mL 放入第 4 管, 如此连续稀释至第 9 管, 取出 10 mL 弃掉。第 10 管只有无菌蒸馏水作对照。这样, 第 1~9 管只含有不同浓度药液各 10 mL。在 800 μ L 的 M-H 肉汤中加入 100 μ L 的五倍子水煎液和 100 μ L 的菌液(浓度 105 CFU/mL), 测定 10 支试管中五倍子的杀

菌情况, 并设空白和阳性对照管。37 °C 条件下培养 24 h, 观察结果。从无菌生长的各管中找出最低稀释液浓度的实验管, 确定最低抑菌浓度。将在最低抑菌浓度测定中, 未见细菌生长的各管培养物中吸取 0.1 mL, 涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 37 °C 条件下培养 24 h, 观察结果。以仍无细菌生长的管内药物浓度记为该药的 MBC。(3)细菌生物被膜培养: 取隔夜培养的含有金黄色葡萄球菌的肉汤, 菌浓度调至 10⁸ CFU/mL, 均分为 3 份, 吸取 50 μ L 加入含有 2 mL 胰酶大豆肉汤培养基及硅胶膜(1 cm \times 1 cm)的 24 孔板中, 37 °C 培养 6 d, 隔天换培养液。(4)银染色法鉴定生物被膜^[3]: 银染色法: 从 24 孔培养板取出硅胶膜, 无菌生理盐水多次充分漂洗, 除去浮游菌; 2.5% 戊二醛 PBS 溶液中固定 1 h; 蒸馏水清洗 1 min; 饱和氯化钙溶液结合 15 min; 蒸馏水清洗 1 min; 5% 硝酸银溶液反应 15 min; 1% 对苯二酚溶液显色 2 min; 蒸馏水漂洗 1 min; 5% 硫代硫酸钠溶液固定 2 min; 蒸馏水漂洗 1 min, 若呈灰黑色则初步可鉴定细菌生物被膜。银染后, 用普通光学显微镜观察, 空白硅胶膜银染后普通光学显微镜观察结果作阴性对照。(5)药物对生物被膜金黄色葡萄球菌的作用: 测定溶液中细菌生长密度(OD)和对硅胶膜上细菌进行计数的方法, 判断药物对生物被膜的作用。用棋盘法对阿奇霉素和不同浓度的五倍子单用或联合用药。用 M-H 将药物稀释成 0.5、0.25、0.125、0.063、0.033 mg/mL 的五倍子溶液, 单独或同时与含有 1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素培养液合并, 以 2 毫升/孔加入 24 孔培养板中。把已形成 BF 的硅胶膜用无菌生理盐水冲洗后放入上述各孔中, 37 °C 分别孵育 24 h, 取出滤膜并用生理盐水冲洗, 除去未黏附菌, 经超声振荡 10 min 脱膜, 涡旋振荡 3 min, 混匀。不加药作为阳性对照, 不加细菌作为阴性对照, 每种浓度为 4 孔。测定每平板厘米滤膜上活菌数(CFU/cm²), 以对数值表示。并与阳性对照组比较。(6)金黄色葡萄球菌的黏附性: 将分离的金黄色葡萄球菌在胰酶大豆肉汤培养基中隔夜培养; 次日用胰酶大豆肉汤调制 1.5 \times 10⁸ CFU/mL 菌悬液; 将医用硅胶膜放入加有 100 μ L 1.5 \times 10⁸ CFU/mL 菌悬液和 300 μ L 胰酶大豆肉汤的 24 孔板中, 在生物被膜形成 48 h, 单独或联合加 1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素和 0.406、0.25、0.125、0.051、0.026 mg/mL 浓度的五倍子; 37 °C 培养 7 d, 24 h 换液

[△] 通讯作者, E-mail: xgcj2010@163.com。

1 次,48 h 后用银染法快速鉴定细菌生物被膜的形成。

2 结 果

2.1 菌膜的形成 培养 3 d 的金黄色葡萄球菌生物被膜细菌呈球状,隐约可见细菌之间的黏液丝相互连接,而大部分细菌仍呈分散状为不成熟生物被膜。培养 7 d 的硅胶膜经银染后,肉眼可见膜表面呈灰黑色,色泽均匀、致密。光学显微镜下可见细菌粘连,形成团块状的群体,细菌间存在絮状及纤维状的间质。

2.2 五倍子和阿奇霉素的最低抑菌浓度与 MBC 测定结果 结果表明,五倍子的最低抑菌浓度 90 为 0.25 mg/mL,最低抑菌浓度 50 为 0.125 mg/mL,MBC 为 0.5 mg/mL;采用液体稀释法所测得的阿奇霉素的最低抑菌浓度为 0.128 mg/mL。

2.3 药物对生物被膜的作用 菌株在培养 72 h 后,在硅胶膜上形成较为成熟的细菌生物被膜,超声振荡-活菌计数结果达

到 10^5 CFU/cm² 左右;同时,空白对照无任何细菌生长;使用 0.25、0.125 mg/mL 五倍子与 1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素联合用药作用于生物被膜后,超声振荡-活菌计数结果与对照组相比有明显下降,菌落数降低至 10^3 CFU/cm³ 左右;但单独使用不同浓度的五倍子对细菌生物被膜作用不明显。

2.4 金黄色葡萄球菌的黏附性 培养 24、48 h 金黄色葡萄球菌生物被膜黏附性,见表 1。结果显示,单独使用 1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素对金黄色葡萄球菌生物被膜黏附性没多大影响,生物被膜上细菌数随时间延长而增加;单独使用五倍子不能达到抑制生物被膜菌生长或杀菌目的;但是不同浓度的五倍子与 1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素联合用药,对生物被膜菌作用明显,特别是最低抑菌浓度浓度以上的五倍子和 1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素联合,可达到抑菌、杀菌的目的。

表 1 生物被膜形成不同时间加药 24 h 后菌落计数结果比较(个/平方厘米², $\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h
对照	1.03±0.45	1.86±0.51	2.17±0.27
1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素	1.21±0.31	1.68±0.38	1.93±0.54
0.25 mg/mL 五倍子	—	1.25±0.27	1.54±0.21
0.125 mg/mL 五倍子	—	1.54±0.24	1.64±0.64
0.063 mg/mL 五倍子	—	1.67±0.15	1.90±0.15
0.033 mg/mL 五倍子	—	1.78±0.51	2.24±0.68
0.25 mg/mL 五倍子、1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素	—	0.15±0.26	0.15±0.69
0.125 mg/mL 五倍子、1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素	—	0.38±0.51	0.34±0.32
0.063mg/mL 五倍子、1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素	—	0.46±0.20	0.51±0.41
0.033 mg/mL 五倍子、1/4 最低抑菌浓度阿奇霉素	—	0.67±0.36	0.85±0.53

注:“—”表示无数据。

3 讨 论

生物被膜可形成于各种生物置入材料表面及体内黏膜表面,由于结构的特殊性,能阻碍或延缓抗生素的通透,具有极强的耐药性及免疫逃避性,传统抗生素治疗对细菌生物被膜引起的感染效果欠佳。迄今为止,如何根治细菌被膜引起的难治性感染是临床上相当棘手的问题。

金黄色葡萄球菌是化脓性感染中最常见的致病菌,由于多重耐药的甲氧西林金黄色葡萄球菌所引起的感染不断上升,故其治疗只有万古霉素或万古霉素加利福平。中成药五倍子具有收敛止血、消除单一细菌菌斑生物被膜等多种生物学效应^[4];十五元环大环内酯类药物阿奇霉素能够抑制生物被膜的形成,提高药物透过菌膜的能力^[5]。因此,本实验选用五倍子和阿奇霉素对生物被膜金黄色葡萄球菌的作用药物,结果表明,浓度大于或等于 0.25 mg/mL 五倍子对浮游金黄色葡萄球菌有杀菌、抑菌的作用,但不能清除生物被膜金黄色葡萄球菌。在测定细菌的黏附性实验中,0.125~0.25 mg/mL 五倍子药液(即大于或等于最低抑菌浓度)作用于金黄色葡萄球菌生物被膜,24、48 h 检测硅胶膜上细菌数量,结果显示细菌数变化很小,这可能与五倍子有效抑菌成分难以透过生物被膜有关;但与 1/4 最低抑菌浓度的阿奇霉素联合用药,可明显清除生物被膜上细菌,说明这两种药物对金黄色葡萄球菌生物被膜有协同作用。

中草药抗菌效果远不及抗生素,所以其抗菌作用一直不被

重视。单用五倍子对浮游的金黄色葡萄球菌有很好的抑菌和杀菌作用,但对生物被膜菌作用不大,但是阿奇霉素可有效促进五倍子透过生物被膜,达到对生物被膜菌的清除作用。因此,选择五倍子与阿奇霉素联合用药,为临床对生物被膜菌引起的相关疾病治疗提供一定的参考依据。

参考文献

[1] 李仲兴,王秀华,赵建宏,等.五倍子等 14 种中药对 112 株金黄色葡萄球菌的抗菌活性观察[J].中国中医药信息杂志,2007,14(10):35-37.
[2] 苏德模,马绪荣.药品微生物学检验技术[M].北京:华龄出版社,2007:472-476.
[3] Pfaller MA,Messer SA,Hollis RJ. Variation in DNA sub-type, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of Candida parapsilosis[J]. Infect Dis,1995,21:9.
[4] 中草药汇编编写组.中草药汇编:上册[M].2 版.北京:人民卫生出版社,1996:155-156.
[5] 王睿,裴斐,柴栋,等.阿奇霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的影响[J].中国抗生素杂志,2002,27(5):293-296.

(收稿日期:2010-07-21)