

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.16.007

文章编号: 1005-8982(2018)16-0034-04

## 牡荆素对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响

蒙传任<sup>1</sup>, 林稚凤<sup>1</sup>, 邢红宇<sup>2</sup>

(1. 海南省海口市第四人民医院 检验科, 海南 海口 571100;  
2. 海南省中医院 检验科, 海南 海口 570311)

**摘要:** **目的** 探讨牡荆素与抗生素联用对铜绿假单胞菌生物膜的影响。**方法** 通过微量肉汤稀释法检测铜绿假单胞菌对应各抗生素的最低抑菌浓度; 利用96孔细胞培养板结合结晶紫染色法探讨牡荆素单独使用及与抗生素联用对铜绿假单胞菌生物膜的影响。**结果** 当牡荆素的浓度 $\geq 31.25 \mu\text{g/ml}$ 时, 能抑制PAO<sub>1</sub>生物膜的形成, 使生物膜的总量从100%减少到 $(80.00 \pm 4.62)\%$ , 且随着牡荆素的浓度增高, 其抑制能力越强; 4种抗生素头孢他啶(CAZ)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(GEN)和左旋氧氟沙星(OFLX)的最低抑菌浓度(MIC)分别为0.5、0.5、2.0和8.0  $\mu\text{g/ml}$ ; 亚抑菌浓度的CAZ、CIP、GEN和OFLX与牡荆素联用时能协同抑制PAO<sub>1</sub>生物膜的形成, 分别使生物膜的总量从100%下降至 $(39.38 \pm 5.32)\%$ 、 $(40.31 \pm 2.95)\%$ 、 $(23.31 \pm 3.95)\%$ 和 $(50.23 \pm 3.14)\%$ 。**结论** 牡荆素能抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成, 且与抗生素联用时有协同作用。

**关键词:** 牡荆素; 铜绿假单胞菌; 生物膜; 联合用药; 协同作用

**中图分类号:** R284

**文献标识码:** A

## Anti-biofilm effect of vitexin combined with antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*

Chuang-ren Meng<sup>1</sup>, Zhi-feng Lin<sup>1</sup>, Hong-yu Xing<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Fourth People's Hospital of Haikou, Haikou, Hainan 571100, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Hainan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou, Hainan 570311, China)

**Abstract: Objective** To explore the anti-biofilm effect of vitexin combined with antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** Minimal inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics to *P. aeruginosa* were determined by broth microdilution method. And 96-well cell culture plate combined with crystal violet was used to study anti-biofilm effect of vitexin alone or combined with antibiotics. **Results** Vitexin could significantly inhibit *P. aeruginosa* biofilm formation from 100.00% to  $(80.00 \pm 4.62)\%$  at the concentration  $\geq 31.25 \mu\text{g/ml}$  in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). The MICs of CAZ, CIP, GEN and OFLX were 0.5, 0.5, 2.0 and 8.0  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. And vitexin showed synergistic inhibition of PAO1 biofilm formation when combined with sub-MIC of CAZ, CIP, GEN and OFLX, which could reduce the total amount of biofilm from 100.00% to  $(39.38 \pm 5.32)\%$ ,  $(40.31 \pm 2.95)\%$ ,  $(23.31 \pm 3.95)\%$  and  $(50.23 \pm 3.14)\%$ , respectively ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Vitexin significantly inhibits biofilm formation of *P. aeruginosa*, and shows synergistic effect when combined with antibiotics.

**Keywords:** vitexin; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; drug combination; synergistic effect

细菌能黏附于物体表面, 并分泌细胞外基质将自身包裹, 形成生物膜。生物膜状态下的细菌具有更强的生存能力, 能抵抗环境中的各种不利因素<sup>[1]</sup>。此

外, 生物膜还能抑制抗生素的渗透作用, 极大的增加了细菌的耐药性<sup>[2]</sup>。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*)被认为是能导致人体生物膜

收稿日期: 2017-04-08

相关感染的最具危害性的病原菌,常导致一系列疾病,如:尿路感染、肾脏感染和肺囊性纤维化等<sup>[3]</sup>。近年来,随着 *P.aeruginosa* 耐药性的增高,传统抗生素往往难以根除已形成的生物膜,因此,从自然界中发掘新的抗菌药物已成为当前研究的热点。

牡荆素 (Vitexin, Vite) 是一种分离自牡荆属植物的一种多酚类化合物,具有一定的抑制细菌生物膜形成的能力。然而,单独使用 Vite 并不能达到最佳抗生物膜效果<sup>[4]</sup>。因此,本研究旨在探讨 Vite 与传统抗生素联合使用对 *P.aeruginosa* 生物膜的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株来源与培养条件** *P.aeruginosa* 标准菌株 PAO<sub>1</sub> 购买自美国 ATCC 标准菌株保存库,于 -80℃ 冰箱保存,使用前室温解冻,并在血琼脂平板培养基上划线接种,过夜培养后调取单个菌落划线接种传 2 代以获得相对稳定状态的菌株。

**1.1.2 主要试剂与设备** TSB 肉汤和 Muller-Hinton II (MH II) 肉汤均购自美国 BD 公司,Vite、头孢他啶 (CAZ)、环丙沙星 (CIP)、左旋氧氟沙星 (OFLX) 和庆大霉素 (GEN) 均购自美国 Sigma 公司,结晶紫颗粒购自天津市化学试剂一厂,96 孔无菌细胞培养板和多功能酶标仪等设备均由海南省海口市第四人民医院检验科提供。

### 1.2 方 法

**1.2.1 药物敏感实验** 用 MH II 肉汤倍比稀释各抗生素储备液后分别加入 100 μl 至 96 孔板中的各孔,作为实验组,同时分别设置阴性对照组 (未加抗生素仅加培养基和细菌) 和对照组 (仅加培养基)。挑取血琼脂平板培养基上过夜培养的单个菌落,用生理盐水调为 0.5 麦氏浊度,再用 MH II 肉汤按 1 : 20 进行稀释,分别向加了抗生素的各孔中加入 10 μl 已稀释好的菌悬液,使最终实验菌浓度约为  $5 \times 10^5$  CFU/ml。置于恒温培养箱中 37℃ 孵育 16 h,读取结果。最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 终点即为肉眼所见能完全抑制细菌生长的抗菌药物的最高稀释度<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 浮游菌生长曲线的绘制** PAO<sub>1</sub> 于血琼脂平板过夜培养后,调取单个菌落,用生理盐水调节浓度至 0.5 麦氏浊度,3 组分别加入系列已配备好的用 LB 肉汤稀释的 Vite 溶液中 (62.5、125.0、250.0 μg/ml),

于 37℃ 恒温摇床 180 r/min 摇菌培养,每隔 8 h,各吸取 200 μl 菌悬液于 96 孔板中,测量 600 nm 处的吸光密度值,连续监测 24 h,绘制时间 - 生长曲线。

**1.2.3 生物膜形成抑制实验** 用 LB 肉汤倍比稀释 Vite 母液至实验浓度 (1 000.00 ~ 15.63 μg/ml),分别加入 198 μl 至 96 孔板中的各孔,备用。PAO<sub>1</sub> 于血琼脂平板培养基过夜培养后,调取单个菌落于装有 LB 肉汤的离心管中过夜摇菌培养,用生理盐水将菌悬液浓度调为约 1 麦氏浊度。再分别加 2 μl 菌悬液于备用的 96 孔板中,37℃ 恒温培养箱中静置孵育 24 h 后,弃去浮游菌,用生理盐水轻洗 2 遍,再分别加入 200 μl 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min,弃去未与板壁细菌结合的结晶紫溶液,并用生理盐水轻洗 3 遍后,分别加入 200 μl 无水乙醇,以溶解与细菌结合的结晶紫,并于 570 nm 处进行比色<sup>[6]</sup>。

**1.2.4 Vite 与抗生素联用对生物膜的影响** 用 LB 肉汤分别稀释 Vite 和各抗生素母液至实验浓度,使 Vite 与抗生素混合后 Vite 的终浓度为 31.25 μg/ml,而 CIP、GEN、CAZ 和 OFLX 的终浓度分别为 0.25、0.50、0.25 和 1.00 μg/ml。其余部分同上。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件,计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组独立样本的差异采用两独立样本 *t* 检验,多组间的比较采用方差分析,若方差齐则两两间的比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 Vite 对 PAO<sub>1</sub> 浮游菌生长的影响

不同浓度 Vite 与阴性对照组比较,250.0 μg/ml 的 Vite 能部分抑制 PAO<sub>1</sub> 浮游菌的生长,差异有统计学意义 (*F* = 168.800, *P* = 0.000)。实验组 Vite 作用 16 和 24 h 可分别使细菌的生长量 (OD<sub>600 nm</sub>) 从 (0.35 ± 0.01) 和 (0.49 ± 0.02) 减少到 (0.17 ± 0.03) 和 (0.26 ± 0.03),差异有统计学意义 (*q* = 3.160 和 3.110, 均 *P* = 0.000)。而当 Vite 的浓度 ≤ 125.0 μg/ml 时,对实验组 PAO<sub>1</sub> 的生长无影响,差异无统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 1。

### 2.2 Vite 抑制 PAO<sub>1</sub> 生物膜的形成

当 Vite 的浓度为 31.25 μg/ml,能使实验组 PAO<sub>1</sub> 生物膜的形成量从 100% 减少到 (80.00 ± 4.62) %,差异有统计学意义 (*t* = 4.428, *P* = 0.002)。且随着 Vite

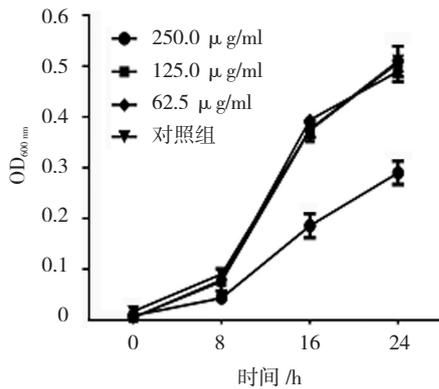
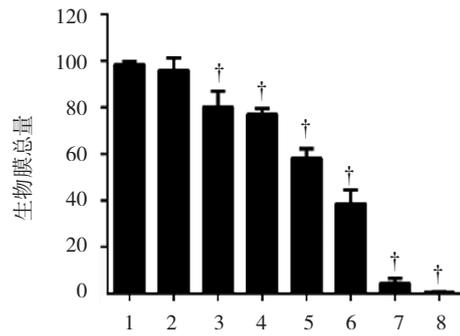


图 1 Vite 对 PAO<sub>1</sub> 浮游菌生长的影响

的浓度增高,其抑制生物膜的能力不断增强。当 Vite 的浓度上升至 1000 μg/ml 时,几乎能完全抑制实验组 PAO<sub>1</sub> 生物膜的形成。而 Vite 的浓度 ≤ 125.0 μg/ml 时,对实验组 PAO<sub>1</sub> 浮游菌的生长并无影响(见图 1),因此, Vite 抑制 PAO<sub>1</sub> 生物膜形成的作用并非完全由其抑制浮游菌生长所导致。见图 2。

### 2.3 Vite 与抗生素协同抑制 PAO<sub>1</sub> 生物膜的形成

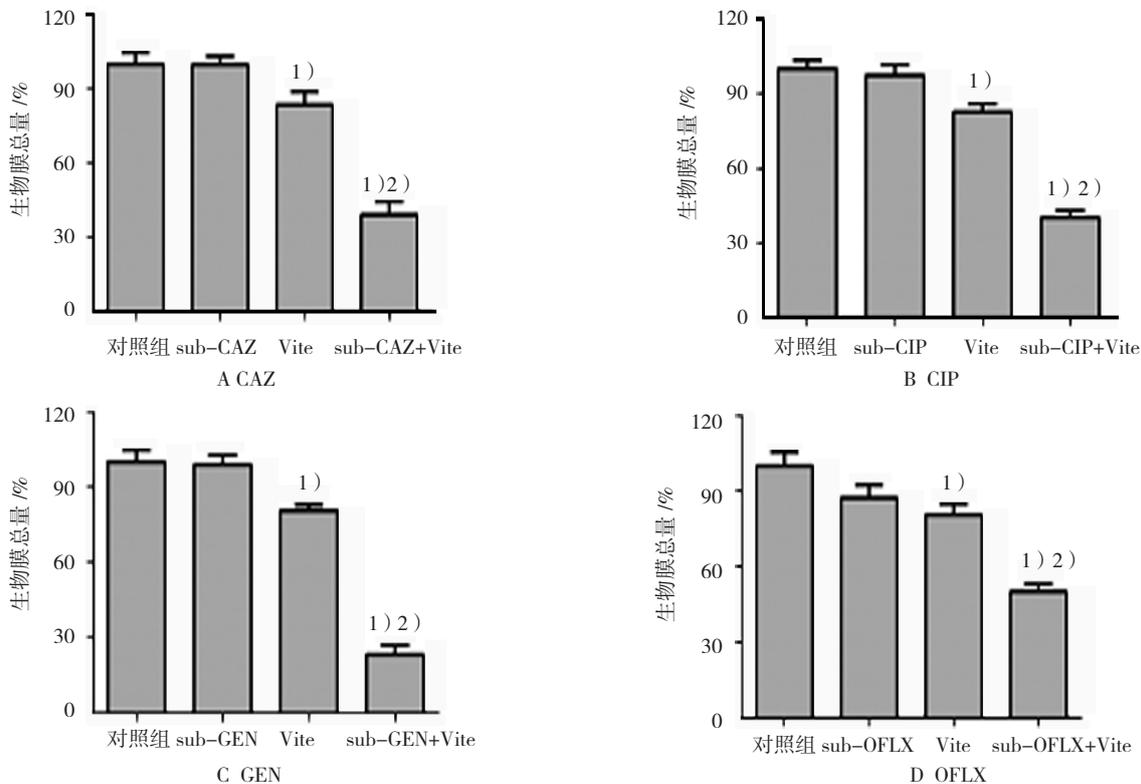
CAZ、CIP、GEN 和 OFLX 的 MIC 值分别为 0.5、0.5、2.0 和 8.0 μg/ml。对照组、CAZ 组、Vite 组、CAZ+Vite 组的生物膜总量分别为(100.0 ± 0.0)%、(99.9 ± 3.3)%、(82.0 ± 3.2)%、(39.4 ± 5.3)%，经方差分析,差异有



1: 对照组; 2: 15.63 μg/ml; 3: 31.25 μg/ml; 4: 62.5 μg/ml; 5: 125.00 μg/ml; 6: 250.00 μg/ml; 7: 500.00 μg/ml; 8: 1000.00 μg/ml. † 与对照组比较, P < 0.05

图 2 Vite 对 PAO<sub>1</sub> 生物膜的抑制作用

统计学意义 ( $F=199.00, P=0.000$ ); 对照组、CIP 组 [(97.4 ± 4.3)%]、Vite 组、CIP+Vite 组 [(40.3 ± 3.1)%] 比较, 差异有统计学意义 ( $F=237.4, P=0.000$ ); 对照组、GEN 组 [(98.9 ± 3.9)%]、Vite 组、GEN+Vite 组 [(23.3 ± 4.1)%] 比较, 差异有统计学意义 ( $F=422.70, P=0.000$ ); 对照组、OFLX 组 [(87.3 ± 5.2)%]、Vite 组、OFLX+Vite 组 [(50.2 ± 3.1)%] 比较, 差异有统计学意义 ( $F=61.04, P=0.000$ )。进一步两两比较经 SNK- $q$  检验, Vite 组较对照组降低 ( $P < 0.05$ ); 各联合组较对照组和 Vite 组降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3。



1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与实验组单独使用 Vite 时比较,  $P < 0.05$

图 3 Vite 与抗生素联用对 PAO<sub>1</sub> 生物膜形成的影响

### 3 讨论

近年来, 细菌生物膜的感染率不断增加, 随着而来的高耐药率给临床诊疗带来极大的不便。传统的抗生素往往难以完全根除体内的生物膜, 而传统抗生素与新型抗生物膜药物联合应用已成为目前研究的热点。本研究通过 96 孔板结合结晶紫染色法半定量分析, 探讨 Vite 的抑制标准菌株 PAO<sub>1</sub> 生物膜的能力, 并进一步探讨其与抗生素 CAZ、GEN、CIP 和 OFLX 的联合应用效果。本研究发现, 当 Vite 浓度  $\geq 31.25 \mu\text{g/ml}$  时能抑制 PAO<sub>1</sub> 生物膜的形成, 且随着浓度增高, 抑膜能力增强, 有明显的剂量依赖性。且当 Vite 与抗生素联用时, 有明显的协同抑制 PAO<sub>1</sub> 生物膜形成的作用。Vite 是一种提取自牡荆属的多酚类化合物。有研究表明, Vite 还具有抵抗金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的作用<sup>[7]</sup>。然而, 其具体机制还未明确。多酚类化合物具有细菌群体密度感应 (quorum sensing, QS) 系统抑制剂的作用。QS 系统是细菌间进行交流的信号系统, 调控着生物膜的形成和分散。*P.aeruginosa* 的 QS 主要包括 2 大系统, 即: Las 系统和 Rhl 系统。Las 系统主要包括 LasI/R 双组份系统, Rhl 系统主要包括 LasI/R 系统。细菌相互聚集时, 自身能分泌一些信号分子, 当这些信号分子浓度升高达到一定的阈值时, 能与 Las 和 Rhl 系统的相应受体结合, 通过信号传导, 调控下游生物膜相关基因的表达或抑制, 进而对生物膜的形成进行调控<sup>[8]</sup>。多酚类化合物可对 QS 系统进行干扰, 抑制 QS 系统的正常调控功能<sup>[9]</sup>, 从而抑制生物膜相关基因表达而抑制生物膜的形成。生物膜的形成主要还受到第二信使环鸟苷二磷酸 (c-di-GMP) 的调控。高浓度的 c-di-GMP 能促进细菌黏附因子的表达, 从而促进菌体的附着与生物膜的形成。而低浓度的 c-di-GMP 可以增强菌体的运动能力及毒素的表达, 而抑制生物膜的形成<sup>[10]</sup>。因此, Vite 的作用机制有可能是通过抑制细菌体内 c-di-GMP 的形成而发挥作用。

不合理使用抗生素, 常使体内残存亚抑菌浓度剂量的药物。这种亚抑菌浓度的抗生素长期存在时, 不但不能有效杀灭细菌, 反而还能促进细菌的突变和耐

药性的增加。而生物膜的耐药性比相应的浮游菌要大, 单一的抗生素使用往往难以根除生物膜。而 Vite 特有的抑制生物膜形成的作用使其与抗生素联用时有协同抑制生物膜形成的作用, 从而可以一定程度上抑制亚抑菌浓度抗生素带来的副作用。

总而言之, Vite 能抑制 *P.aeruginosa* 生物膜的形成, 且当其与抗生素 CIP、CAZ、GEN 和 OFLX 联用使有协同作用。有望成为临床治疗细菌生物膜的一线用药。

#### 参 考 文 献:

- [1] HØIBY N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections[J]. Pathog Dis, 2014, 70(3): 205-211.
- [2] TAYLOR P K, YEUNG A T, HANCOCK R E. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies[J]. J Biotechnol, 2014, 191: 121-130.
- [3] RYBTKE M, HULTQVIST L D, GIVSKOV M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response[J]. J Mol Biol, 2015, 427(23): 3628-3645.
- [4] DAS M C, SANDHU P, GUPTA P, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: a combinatorial study with azithromycin and gentamicin[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23347.
- [5] Clinical and laboratory standards institute (CLSI) performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100, 2016.
- [6] SHI H Q, SUN F J, CHEN J H, et al. Opposite effects of cefoperazone and ceftazidime on S-ribosylhomocysteine lyase / autoinducer-2 quorum sensing and biofilm formation by an *Escherichia coli* clinical isolate[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5): 2334-2340.
- [7] KANNATHASAN K, SENTHILKUMAR A, VENKATESALU V. In vitro antibacterial potential of some Vitex species against human pathogenic bacteria[J]. Asian Pac. J. Trop. Med, 2011, 4: 645-648.
- [8] LEE J, ZHANG L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Protein Cell, 2015, 6(1): 26-41.
- [9] YIN H, DENG Y, WANG H, et al. Tea polyphenols as an antivirulence compound Disrupt Quorum-Sensing Regulated Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16158.
- [10] HA D G, O'TOOLE G A. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review[J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(2): MB-0003-2014.

(张蕾 编辑)