

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.26.006

文章编号: 1005-8982(2017)26-0030-05

## 鞣质联合环丙沙星对鲍曼不动杆菌生物膜形成的影响\*

彭丹<sup>1</sup>, 宋丽<sup>2</sup>, 陈泽慧<sup>1</sup>, 董泽令<sup>1</sup>, 周小仙<sup>2</sup>, 陈安林<sup>1</sup>, 李亚男<sup>2</sup>

(1. 遵义医学院附属医院, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义医学院, 贵州 遵义 563003)

**摘要:目的** 研究石榴皮提取物鞣质联合环丙沙星(CIP)对鲍曼不动杆菌(Ab)生物膜形成的影响。**方法** 采用 2 倍稀释法测得石榴皮提取物鞣质和 CIP 对 Ab ATCC19606 的最低抑菌浓度(MIC);将 1/2MIC、MIC、2MIC 浓度的鞣质和 CIP 单独及联合用药作用于 Ab 生物膜 4、8、24 和 48 h,采用结晶紫法和荧光显微镜法观察生物膜的形成。**结果** 鞣质和 CIP 对 Ab 的 MIC 值为 1.95 和 0.50 mg/ml;联合用药较单独用药对 Ab 生物膜的形成影响大,且 2MIC 鞣质 + 2MIC CIP 联合作用 24 h,对生物膜形成影响最大。**结论** 石榴皮提取物鞣质和 CIP 联合用药对生物膜形成的影响比单独用药明显,且 2MIC 鞣质 + 2CIP 联合用药对 Ab 生物膜作用 24 h 影响效果最佳。

**关键词:** 鲍曼不动杆菌;生物膜;石榴皮提取物鞣质;环丙沙星

**中图分类号:** R446.5

**文献标识码:** A

## Tannin combination with Ciprofloxacin could effect on biofilm of *Acinetobacter baumannii*\*

Dan Peng<sup>1</sup>, Li Song<sup>2</sup>, Ze-hui Chen<sup>1</sup>, Ze-ling Dong<sup>1</sup>,  
Xiao-xian Zhou<sup>2</sup>, An-lin Chen<sup>1</sup>, Ya-nan Li<sup>2</sup>

(1. The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China;  
2. Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of tannin extracted from *Pomegranate* rind combined with Ciprofloxacin (CIP) on the biofilm of *Acinetobacter baumannii* (Ab). **Methods** The minimal inhibitory concentrations (MIC) of tannin and CIP to Ab ATCC19606 were determined by broth dilution method. The 1/2MIC, MIC and 2MIC of tannin, CIP and their combination acted on Ab for 4, 8, 24 and 48 h, respectively; then the biofilm formation of Ab was observed by crystal violet staining assay and fluorescence microscopy. **Results** The MIC of tannin and CIP to Ab ATCC19606 were 1.95 mg/ml and 0.50 mg/ml respectively. The effect of tannin or CIP separately on the biofilm of Ab was weaker than that of their combination. And their combination could have some effect on the biofilms, of which the combined use of 2MIC tannin and 2MIC CIP for 24 h had the greatest effect on biofilm formation of Ab. **Conclusions** Combined use of tannin extracted from *Pomegranate* rind and CIP has more obvious effect on the biofilm formation of Ab, moreover, the combination of 2MIC tannin and 2MIC CIP for 24 h has the best effect.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*; biofilm; tannin extracted from *Pomegranate* rind; Ciprofloxacin

鲍曼不动杆菌(*acinetobacter baumannii*, Ab)为革兰阴性非发酵菌,广泛存在于自然界、医院环境及健康人的皮肤;该菌生存力及黏附力极强,可长期定植于医院,易形成生物膜,使耐药性大大增加,导致感

染难以控制<sup>①</sup>。生物膜是细菌生长过程中为适应环境的一种优势生存方式。生物膜一旦形成,保护细菌不受抗菌药物和消毒剂的影响,其膜内细菌耐药性比浮游菌增加 10 ~ 1 000 倍<sup>②</sup>。如今,新开发一种抗生素周

收稿日期:2017-01-04

\* 基金项目:贵州省科技厅合作计划[No:黔科合 LH(2015)7480];遵义医学院基金[No:院字(2009)22号]

[通信作者] 陈泽慧, E-mail: 941291773@qq.com

期长,不利于感染的控制,而且西药容易产生耐药,那么寻找新的治疗方案刻不容缓。我国中草药资源丰富,来源范围广、价格便宜、毒副作用小、不轻易产生耐药性、在病原体内有多方面的作用及药效,为西药抗菌药物之后的一个新药方向。相关文献报道,五倍子、大蒜素、苦参等中药影响细菌生物膜<sup>[3-5]</sup>。鞣质是石榴皮主要成分,主要药理作用是收敛、抗菌,本实验将研究其是否对生物膜有破坏作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株来源** 实验菌株:鲍曼不动杆菌 ATCC19606;质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、金黄色葡萄球菌 ATCC25923,以上购自上海宝录生物有限公司。

**1.1.2 药 物** 石榴皮购自遵义树林大药房,经遵义医学院附属医院药剂科鉴定为合格品;环丙沙星(Ciprofloxacin,CIP)购自上海生工生物工程有限公司。

**1.1.3 主要仪器及试剂** 日本 Olympus 荧光显微镜,法国梅里埃公司的 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析仪、配套药敏卡,北京百灵威科技有限公司结晶紫,美国 Thermo 酶标仪等。

### 1.2 方 法

**1.2.1 鞣质的提取及原液的制备** 石榴皮粉碎后,经过加热回流法提取鞣质,粗提物分别经 5%三氯化铁乙醇溶液和紫外分光光度计做定性和定量检测,按照 2010 版药典以没食子酸的含量作为质控标准;鞣质提取成功后,称取 0.1875 g 溶于 3 ml M-H 肉汤中,配制浓度为 62.50 mg/ml。

**1.2.2 鞣质对 Ab 最低抑菌浓度的测定** 将 Ab ATCC19606 配制成 0.5 麦氏菌液浓度,然后将菌液稀释 100 倍;准备 8 支无菌试管,1~6 号试管分别加入 1 ml 肉汤,将 1 ml 鞣质原液加入 1 号试管,混匀后再吸出 1 ml 于第 2 管,依次进行 2 倍稀释,6 号管吸出 1 ml 弃去;7 号管作为阴性对照,8 号管为阳性对照,进行孵育培养,观察最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,MIC)。

**1.2.3 CIP 原液的配制** 使用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪,使用大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 进行质控,用药敏卡检测 CIP 对 Ab 的药敏结果,根据其敏感范围( $<1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ),称取 0.04 g CIP,溶于 10 ml M-H 肉汤当中,配制浓度为 4 mg/ml CIP 溶液。

**1.2.4 CIP 对 Ab 的 MIC 测定** 将 Ab ATCC19606 配制成 0.5 麦氏菌液浓度,然后将菌液稀释 100 倍;准备 8 支无菌试管,1~6 号试管分别加入 1 ml 肉汤,将 1 ml CIP 原液加入 1 号试管,混匀后再吸出 1 ml 于第 2 管,依次进行 2 倍稀释,6 号管吸出 1 ml 弃去;7 号管作为阴性对照,8 号管为阳性对照,进行孵育培养,观察 MIC 值。

**1.2.5 生物膜的建立** 吸取一定量菌液浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/ml 的 Ab 加入孔板内,37℃静置培养 48 h,形成生物膜。

**1.2.6 结晶紫微孔板法** 将形成生物膜的孔板内加入 100  $\mu\text{l}$  1/2MIC、1MIC、2MIC 鞣质溶液,1/2MIC、1MIC、2MIC 的 CIP 溶液,以及联合用药鞣质和 CIP 各 50  $\mu\text{l}$ ,100  $\mu\text{l}$  PBS 为对照组,37℃分别培养 4、8、24 和 48 h,在相应的时间将抗菌药物吸出,清洗掉抗菌药物;每孔加入 200  $\mu\text{l}$  0.25 g/L 结晶紫染液,染色 20 min,洗掉多余的染液;每孔加入 200  $\mu\text{l}$  95%乙醇脱色 15 min,酶标仪检测微孔板在 570 nm 处的光密度值。

**1.2.7 FITC-ConA 标记显微镜技术** 将形成生物膜的孔板中加入 1ml 1/2MIC、1MIC、2MIC 鞣质溶液,1/2MIC、1MIC、2MIC 的 CIP 溶液,以及联合用药鞣质和 CIP 各 0.5 ml。对照孔加入 1 ml 无菌 PBS 溶液,37℃培养 24 h;用 50  $\mu\text{l}$  FITC-ConA 荧光染料染色,在荧光显微镜波长为 480 nm 处观察不同浓度鞣质和 CIP 对 Ab 生物膜形成的影响。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 鞣质和 CIP 对 Ab 的 MIC 值

石榴皮提取物鞣质和 CIP 对 Ab ATCC19696 的 MIC 分别为 1.95 和 0.50 mg/ml。

### 2.2 鞣质和 CIP 对 Ab 已形成生物膜的破坏作用

**2.2.1 结晶紫微孔板法结果** 各组 4、8、24 和 48 h 对生物膜形成影响比较,经方差分析,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。单用组对形成的生物膜作用 4 h 后,与空白组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );单用组作用 8 h 后,不同浓度的 CIP 与空白组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而不同浓度的鞣质单用组与空白组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );单用

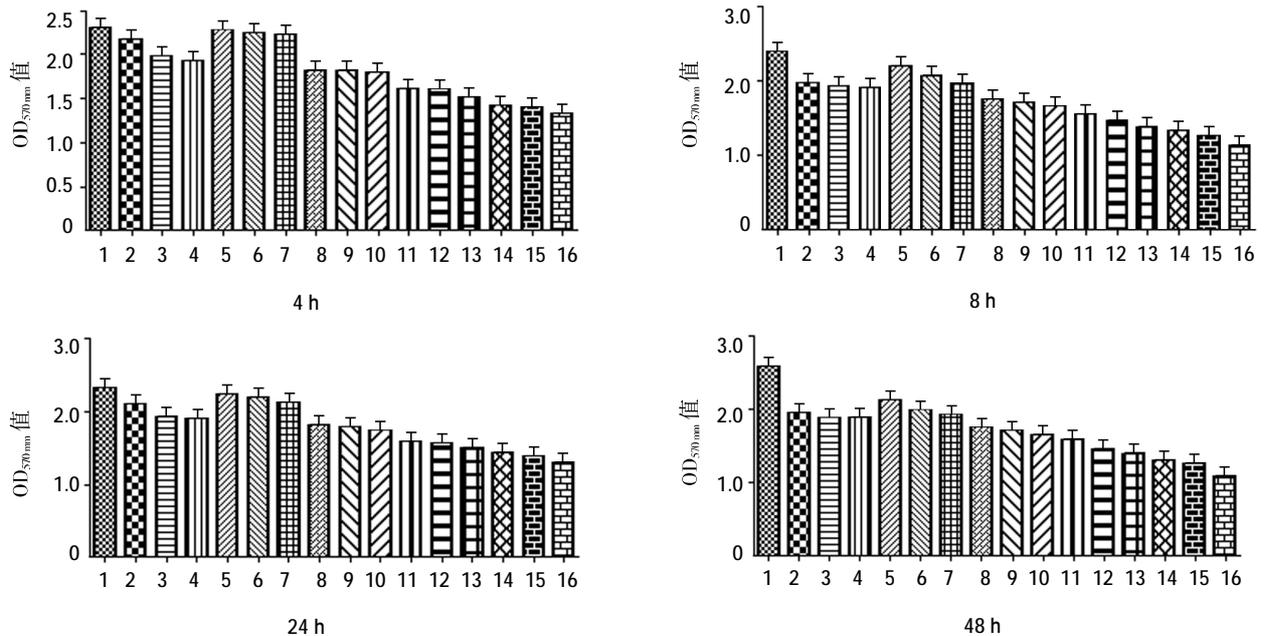
组分别作用 24 和 48 h 后,不同浓度的鞣质、CIP 单用组与空白组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。不同浓度的鞣质和 CIP 联合组对 Ab 生物膜的影响,与空

白组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随着药物浓度逐渐增加,光密度值逐渐降低,其中以 2MIC 鞣质 +2MIC CIP 组作用 24 h 效果最好。见附表和图 1。

附表 不同药物组合对 Ab 生物膜形成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	4 h	8 h	24 h	48 h
空白组	2.01 ± 0.24	2.15 ± 0.13	2.20 ± 0.42	2.23 ± 0.48
1/2MIC 鞣质组	1.71 ± 0.28	1.76 ± 0.25 <sup>1)</sup>	1.63 ± 0.14 <sup>1)</sup>	1.65 ± 0.23 <sup>1)</sup>
MIC 鞣质组	1.58 ± 0.43	1.54 ± 0.51 <sup>1)</sup>	1.53 ± 0.22 <sup>1)</sup>	1.62 ± 0.17 <sup>1)</sup>
2MIC 鞣质组	1.62 ± 0.18	1.68 ± 0.18 <sup>1)</sup>	1.66 ± 0.45 <sup>1)</sup>	1.58 ± 0.28 <sup>1)</sup>
1/2MIC CIP 组	1.94 ± 0.31	1.90 ± 0.18	1.71 ± 0.30 <sup>1)</sup>	1.73 ± 0.32 <sup>1)</sup>
MIC CIP 组	1.87 ± 0.17	1.88 ± 0.16	1.76 ± 0.19 <sup>1)</sup>	1.86 ± 0.31 <sup>1)</sup>
2MIC CIP 组	1.90 ± 0.42	1.94 ± 0.41	1.74 ± 0.25 <sup>1)</sup>	1.63 ± 0.18 <sup>1)</sup>
1/2MIC鞣质 +1/2MIC CIP 组	1.45 ± 0.44 <sup>1)2)</sup>	1.43 ± 0.47 <sup>1)2)</sup>	1.33 ± 0.33 <sup>1)2)</sup>	1.23 ± 0.38 <sup>1)2)</sup>
1/2MIC 鞣质 +MIC CIP 组	1.45 ± 0.14 <sup>1)2)</sup>	1.36 ± 0.40 <sup>1)2)</sup>	1.34 ± 0.34 <sup>1)2)</sup>	1.15 ± 0.14 <sup>1)2)</sup>
1/2MIC鞣质 +2MIC CIP 组	1.30 ± 0.25 <sup>1)2)</sup>	1.31 ± 0.16 <sup>1)2)</sup>	1.21 ± 0.38 <sup>1)2)</sup>	1.11 ± 0.32 <sup>1)2)</sup>
MIC鞣质 +1/2MIC CIP 组	1.14 ± 0.30 <sup>1)2)</sup>	1.12 ± 0.28 <sup>1)2)</sup>	0.73 ± 0.19 <sup>1)2)</sup>	0.72 ± 0.24 <sup>1)2)</sup>
MIC鞣质 +MIC CIP 组	1.08 ± 0.14 <sup>1)2)</sup>	1.06 ± 0.34 <sup>1)2)</sup>	0.76 ± 0.24 <sup>1)2)</sup>	0.66 ± 0.26 <sup>1)2)</sup>
MIC鞣质 +2MIC CIP 组	1.03 ± 0.29 <sup>1)2)</sup>	1.03 ± 0.25 <sup>1)2)</sup>	0.65 ± 0.35 <sup>1)2)</sup>	0.68 ± 0.17 <sup>1)2)</sup>
2MIC鞣质 +1/2MIC CIP 组	0.87 ± 0.11 <sup>1)2)</sup>	0.85 ± 0.27 <sup>1)2)</sup>	0.51 ± 0.22 <sup>1)2)</sup>	0.53 ± 0.30 <sup>1)2)</sup>
2MIC 鞣质 +MIC CIP 组	0.83 ± 0.27 <sup>1)2)</sup>	0.84 ± 0.33 <sup>1)2)</sup>	0.48 ± 0.13 <sup>1)2)</sup>	0.49 ± 0.16 <sup>1)2)</sup>
2MIC 鞣质 +2MIC CIP 组	0.76 ± 0.14 <sup>1)2)</sup>	0.72 ± 0.14 <sup>1)2)</sup>	0.40 ± 0.17 <sup>1)2)</sup>	0.46 ± 0.1 <sup>1)2)</sup>
F 值	1602.32	820.61	478.50	520.13
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)与空白组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与鞣质、CIP 单用组比较,  $P < 0.05$

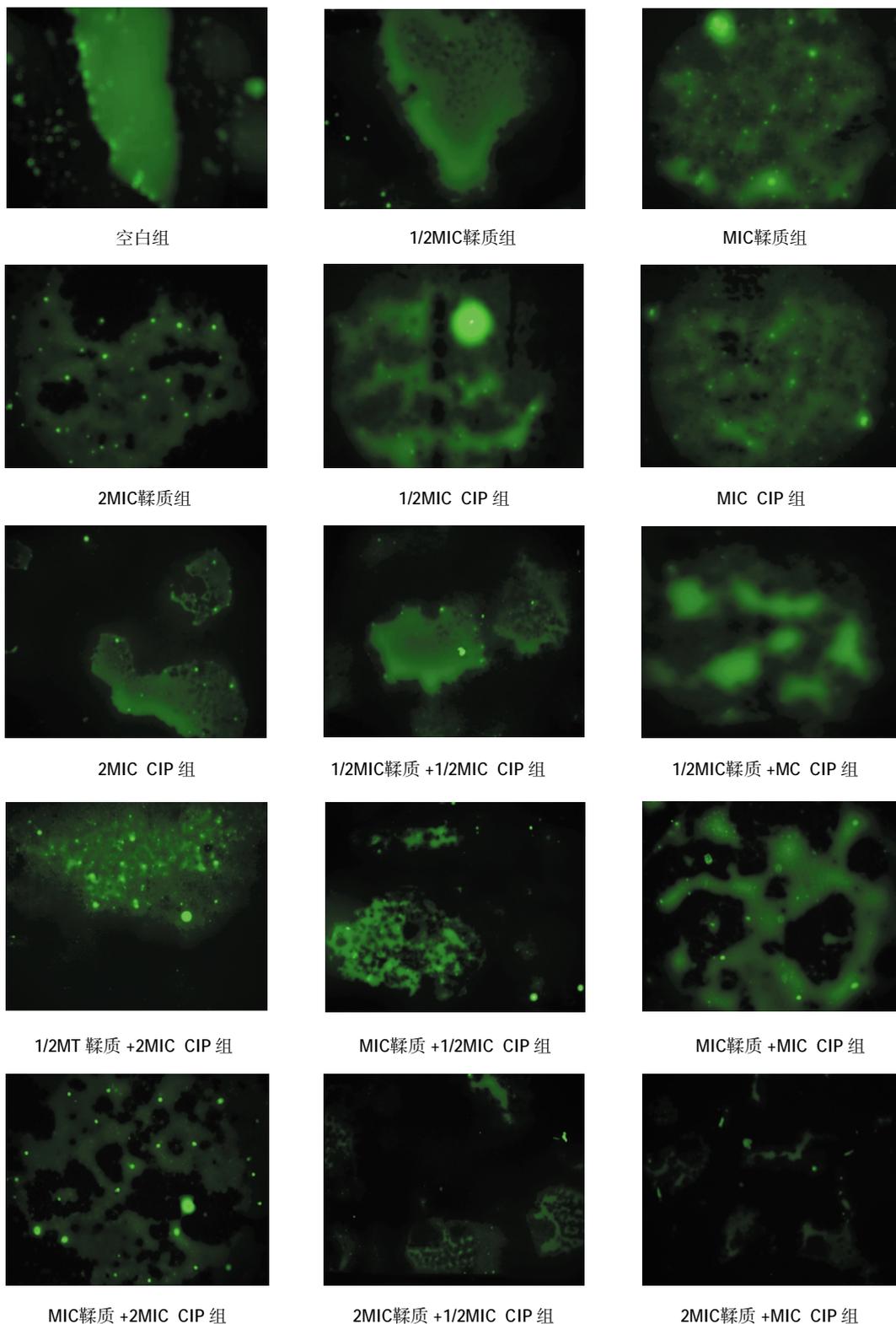


1: 空白组;2:1/2MIC鞣质组;3:MIC鞣质组;4:2MIC鞣质组;5:1/2MIC CIP 组;6:MIC CIP 组;7:2MIC CIP 组;8:1/2MIC鞣质 +1/2MIC CIP 组;9:1/2MIC鞣质 +MIC CIP 组;10:1/2MIC鞣质 +2MIC CIP 组;11:MIC鞣质 +1/2MIC CIP 组;12:MIC鞣质 +MIC CIP 组;13:MIC鞣质 +2MIC CIP 组;14:2MIC鞣质 +1/2MIC CIP 组;15:2MIC鞣质 +MIC CIP 组;16:2MIC鞣质 +2MIC CIP 组

图 1 不同药物组合对 Ab 生物膜形成的影响

2.2.2 FITC-ConA 标记显微镜技术结果 不同浓度的鞣质和 CIP 单用及联合用药对 Ab 生物膜作用 24 h 后,经 FITC-ConA 荧光染色后在荧光显微镜 480 nm 处观察细菌生物膜的形成情况。空白组、不同浓度鞣质和 CIP 单用,显微镜下均可见大片明亮绿

色荧光;当 1/2MIC 鞣质与不同浓度 CIP 联用后,可见较疏松的绿色荧光;1MIC 鞣质与不同浓度 CIP 联用后,可见筛网状绿色荧光;2MIC 鞣质与不同浓度的 CIP 联用后,绿色荧光明显减少,以 2MIC 鞣质与 2MIC CIP 联用作用最明显。见图 2。





2MIC鞣质 + 2MIC CIP 组

图 2 不同药物组合对 Ab 生物膜形成的影响  
(荧光显微镜 × 400)

### 3 讨论

近年来 Ab 发病率和致病率日趋增多,且对多种抗菌药物耐药,其主要的的原因之一是产生生物膜。有研究表明,Ab 的耐药性与生物膜的产生密切相关,膜内细菌耐药性比浮游菌增加 10~1 000 倍,给临床抗感染带来极大挑战和困难<sup>[6]</sup>。目前使用较为广泛的药物就是抗生素,但是单独使用某种抗生素,Ab 很快出现耐药;而且新开发一种抗生素周期长,很不利于感染的控制,联合用药成为目前首选方案。石榴皮提取物鞣质,具有收敛、抗菌作用。本课题组前期研究发现鞣质对 Ab 具有较好的抑菌效果;CIP 为合成的第 3 代喹诺酮类,为治疗 Ab 感染常用药物。国内学者殷网虎等<sup>[7]</sup>研究白藜芦醇对 Ab 生物膜具有破坏作用;史鹏等<sup>[8]</sup>研究得出抗菌肽 LL-37 对 Ab 生物膜具有破坏作用;国外学者 LUÍS 等<sup>[9]</sup>研究没食子酸、咖啡酸及绿原酸对葡萄球菌生物膜的破坏作用;ALVES 等<sup>[10]</sup>研究茺荑精油成分对 Ab 生物膜的影响。

本实验通过结晶紫微孔板法和 FITC-ConA 标记显微镜技术,探讨石榴皮提取物鞣质与 CIP 单独及联合用药对生物膜的作用。在结晶紫微孔板法中,单用组对生物膜作用 4 h 后,与空白组比较无差异;单用组作用 8 h 后,不同浓度的 CIP 单用组与空白组比较无差异,不同浓度的鞣质单用组比较有差异;单用组在分别作用 24 和 48 h 后,不同浓度的鞣质和 CIP 单用组与空白组比较有差异。不同浓度的鞣质和 CIP 联合对 Ab 生物膜形成,与空白组比较有差异。联合用药对生物膜形成影响较为明显。FITC-ConA 标记显微镜技术结果标明,空白组、不同浓度鞣质和 CIP 单用,显微镜下均可见大片明亮绿色荧光;当 1/2 MIC

鞣质与不同浓度的 CIP 联用后,可见较疏松的绿色荧光;1MIC 鞣质与不同浓度的 CIP 联用后,可见筛网状绿色荧光;2MIC 鞣质与不同浓度的 CIP 联用后,绿色荧光明显减少,以 2MIC 鞣质与 2MIC CIP 联用作用最明显。联合用药对生物膜影响明显。

本研究只进行了体外实验,以后还需进行体内实验,最终为控制 Ab 的感染提供科学依据。

### 参 考 文 献:

- [1] LONGO F, VUOTTO C, DONELLI G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*[J]. *New Microbiol*, 2014, 37(2): 119-127.
- [2] de la FUENTE-NÚÑEZ C, REFFUVEILLE F, HANEY E F, et al. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(5), DOI: org/10.1371/journal.ppat.1004152.
- [3] GAYOSO C M, MATEOS J, MEÉNDEZ J A, et al. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *acinetobacter baumannii* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 13(2): 460-476.
- [4] GURUNG J, KHYRIEM A B, BANIK A, et al. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *acinetobacter baumannii* and *pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit[J]. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 2013, 17(4): 214-218.
- [5] LUO L, WU L, XIAO Y, et al. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones[J]. *BMC microbiology*, 2015, 15(1): 62-69.
- [6] DHABAAN G N, ABUBAKAR S, CERQUEIRA G M, et al. Imipenem treatment induces expression of important genes and phenotypes in a resistant *acinetobacter baumannii* isolate[J]. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2016, 60(3): 1370-1376.
- [7] 殷网虎, 曹美林, 李佳, 等. 白藜芦醇对鲍曼不动杆菌生物膜的抑制作用研究[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(6): 1011-1013.
- [8] 史鹏伟, 高艳彬, 卢志阳, 等. 抗菌肽 LL-37 对鲍曼不动杆菌生物膜的抑制作用[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(3): 426-429.
- [9] LUÍS Â, SILVA F, SOUSA S, et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids[J]. *Biofouling*, 2014, 30(1): 69-79.
- [10] ALVES S, DUARTE A, SOUSA S, et al. Study of the major essential oil compounds of *coriandrum sativum* against *acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing[J]. *Biofouling*, 2016, 32(2): 155-165.

(童颖丹 编辑)