

## ·论 著·

## 银翘散抗铜绿假单胞菌生物膜及与阿奇霉素的协同作用

张伟铮<sup>1</sup>, 韩菊梅<sup>2</sup>, 屈平华<sup>1</sup>, 李松<sup>1</sup>, 邓光远<sup>1</sup>, 陈茶<sup>1\*</sup>

1.广东中医院大学城医院检验科, 广东 广州 510006; 2.广东工业大学医院, 广东 广州 510006

**摘要:** **目的** 研究银翘散对铜绿假单胞菌生物膜的影响及与阿奇霉素的协同作用。**方法** 选取铜绿假单胞菌野生株POA1建立体外生物膜模型;微量倍比稀释法检测银翘散、阿奇霉素对铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度;棋盘稀释法测定银翘散和阿奇霉素的协同抗菌作用;银染法观察药物对生物膜形态的影响。**结果** 银翘散抑制铜绿假单胞菌生物膜形成的MIC是500g/L,阿奇霉素抑制铜绿假单胞菌生物膜形成的MIC是250.0mg/L,两药联合后MIC分别为125.0g/L和62.5mg/L,抑菌分级指数是(FIC)是0.5,提示两药协同作用明显。**结论** 银翘散具有抗铜绿假单胞菌生物膜作用,与阿奇霉素有协同抗菌作用。

**关键词:** 铜绿假单胞菌;生物膜;银翘散;协同作用

中图分类号:R378.99 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2015)06-655-03

Effects of Yinqiao powder against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and its synergism with azithromycin

ZHANG Wei-Zheng<sup>1</sup>, HAN Ju-Mei, QU Ping-Hua, LI Song, DENG Guang-Yuan, CHEN Cha

1. Department of Laboratory Medicine, the Tradition Chinese Medicine University Hospital, Guangzhou 510006, Guangdong, P.R.China

Corresponding author: CHEN Cha, E-mail: chench906@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of Yinqiao powder against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and its synergistic with azithromycin. **Methods** The wild type PAO1 of *Pseudomonas aeruginosa* were cultured to establish biofilm formation. Biofilm was observed after AgNO<sub>3</sub> staining. Minimum inhibition concentrations (MICs) of Yinqiao powder and azithromycin were measured by doubling dilution. Checkerboard method was used to examine synergism of Yinqiao powder and azithromycin. **Results** MIC of Yinqiao powder against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms was 500.0g/L and azithromycin 250.0mg/L. After the combination of two-drugs the MIC was 125.0g/L and 62.5mg/L. Fractional inhibitory concentration (FIC) was 0.5, which showed a synergism with azithromycin. **Conclusion** Yinqiao powder could inhibit the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, and there is a synergistic effect in combination with Azithromycin.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilms; Yinqiao powder; Synergism

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属于非发酵菌类假单胞菌属。广泛分布于自然界并在人体皮肤上定值,是引起肺囊性纤维化(Cystic fibrosis, CF)和弥漫性泛细支气管炎(Diffuse panbronchiolitis, DPB)的最重要的病原菌,也是近年来医院内感染的重要条件致病菌和耐药菌之一。研究表明铜绿假单胞菌在感染灶中多表现为高度耐药性以及生物膜(Biofilm, BF)形成,从而使疾病难于治愈<sup>[1]</sup>。

国内外研究表明大环内脂类药物(克拉霉素、阿奇霉素)对生物膜有抑制作用,在治疗黏液型铜绿假单胞菌感染的CF和DPB患者中有很大的帮助,但长期使用会导致肝功能损伤<sup>[2]</sup>。银翘散源于清代名医吴鞠通所著《温病条辨》,是中医学清热解毒法的代表方剂,金银花作为银翘散的主要成分,其水煎液对铜绿假单胞菌生物膜有很好的抑制作用<sup>[3]</sup>。银翘散作为复方制

剂,有资料显示<sup>[4]</sup>其对多种细菌、病毒具有抑制作用,但能不能抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成还未见报道。因此,本研究拟通过体外实验,探讨银翘散对铜绿假单胞菌生物膜的影响及与阿奇霉素的协同作用。

## 1 材料与方法

**1.1 药物** 银翘散含连翘9g、金银花9g、苦桔梗6g、薄荷6g、淡竹叶4g、生甘草5g、荆芥穗5g、淡豆豉5g、牛蒡子9g,以上九味,粉碎成细粉,过筛,混匀,即得。由广东省中医院大学城医院中药房提供。根据生药量浓度表示法水煎制备1 000g/L的100%银翘散煎剂。用无菌滤纸过滤,装瓶备用。阿奇霉素(上海生工BBI)。

**1.2 主要试剂与试剂** 血琼脂平板、营养琼脂(江门凯林),LB肉汤(自配),硅胶片、96孔板、24孔板(广州科祥),戊二醛、氯化钙、硝酸银、对苯二酚、硫代硫酸

基金项目: 广东省中医药局科研课题(No.20132132)

作者简介: 张伟铮(1983~),男,硕士,主管技师,研究方向:微生物鉴定及耐药机制研究。

\*通讯作者: 陈茶, E-mail: chench906@163.com

钠(上海生工),DPH-9162型电热恒温培养箱(上海一恒),CX21型光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 菌株 铜绿假单胞菌野生株POA1(本实验室保存),质控菌株铜绿假单胞菌ATCC27853。

1.4 体外生物膜模型的建立及鉴定 挑选新鲜培养的铜绿假单胞菌POA1单个菌落,置于20mL LB肉汤中,170r/min,摇菌4~5h,比浊仪调置0.5McFarland浓度,备用,在24孔板中每孔加入已高压灭菌的硅胶片,加入2mL LB肉汤,再在每孔中加入50μL 0.5McFarland的菌悬液,37℃连续培养7d,隔天换液,在倒置显微镜下观察细菌生物膜的生成情况。采用上述方法培养7d后,取出硅胶片,经灭菌生理盐水多次充分漂洗,去掉浮游菌;2.5%戊二醛PBS溶液中固定1h;蒸馏水清洗1min;饱和CaCl<sub>2</sub>溶液结合15min;蒸馏水清洗1min;5%AgNO<sub>3</sub>溶液反应15min;1%对苯二酚溶液显色2min;蒸馏水漂洗1min;5%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>固定2min;蒸馏水清洗1min。光镜下观察。

1.5 测定银翘散、阿奇霉素抑制铜绿假单胞菌生物膜形成的MIC 根据生物膜形成时间,用LB肉汤将备用银翘散煎剂稀释成5个浓度梯度500、250、125、62.5、31.25g/L,阿奇霉素用LB肉汤稀释成5个浓度梯度500、250、125、62.5、31.25g/L。上述各浓度的药物分别加入已置入无菌硅胶片的24孔板中每孔2mL。同时设阴性对照孔(未加中药只含培养基),每药物孔中加入上述菌液,除阴性对照孔外,每孔100μL。37℃培养7d,隔天换液,以无生物膜形成的最小药物稀释度为MIC。

1.6 测定银翘散和阿奇霉素的协同抑制生物膜形成作用 银翘散煎剂和阿奇霉素分别用LB肉汤稀释成5个浓度梯度。用棋盘稀释法向已置入无菌硅胶片的96孔板中的行和列上分别加入1mL各浓度梯度的药物,形成5×5共25个不同浓度比例的联合药敏孔,再每孔加入100μL菌液。37℃培养7d,隔天换液,观察结果,并计算抑菌浓度指数(FIC)。

2 结果

2.1 生物膜模型的建立与鉴定 光学显微镜4×10倍下观察,整个视野可见散落的黑点或黑斑,无黑染絮状膜样物,则判为阴性结果;若见浓厚的黑染絮状膜样物质覆盖,层次多,致密,为阳性结果,黑染絮状膜样物为BF。空白硅胶片银染后,整个视野可见散落的黑点或黑斑,无黑染的絮状膜样物。细菌接种培养1d后硅胶片可见散落的黑点或黑斑;培养3d后可见片状黑斑;培养5d后可见浓厚的黑染絮状膜样物质覆盖,见图1。

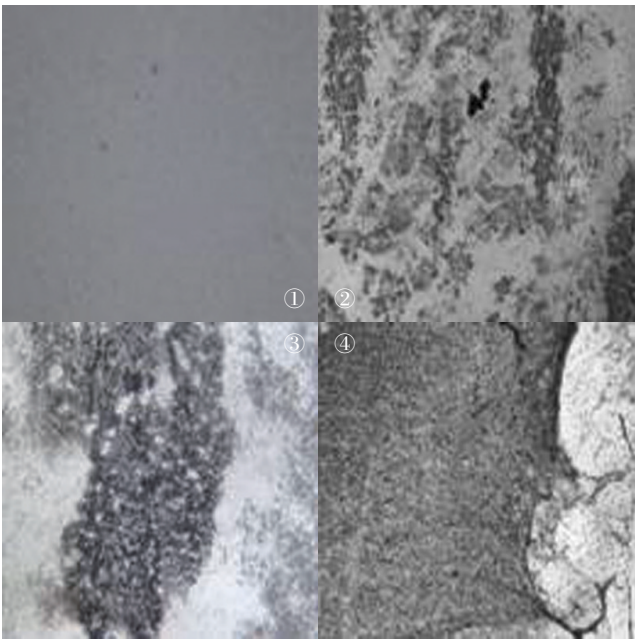


图1 ①~④分别是空白对照、培养1d、3d和5d的生物膜形态(×400)

Fig.1 ①~④ numbers are the blank control, biofilm morphology cultured for 1 day, 3 days and 5 days(×400)

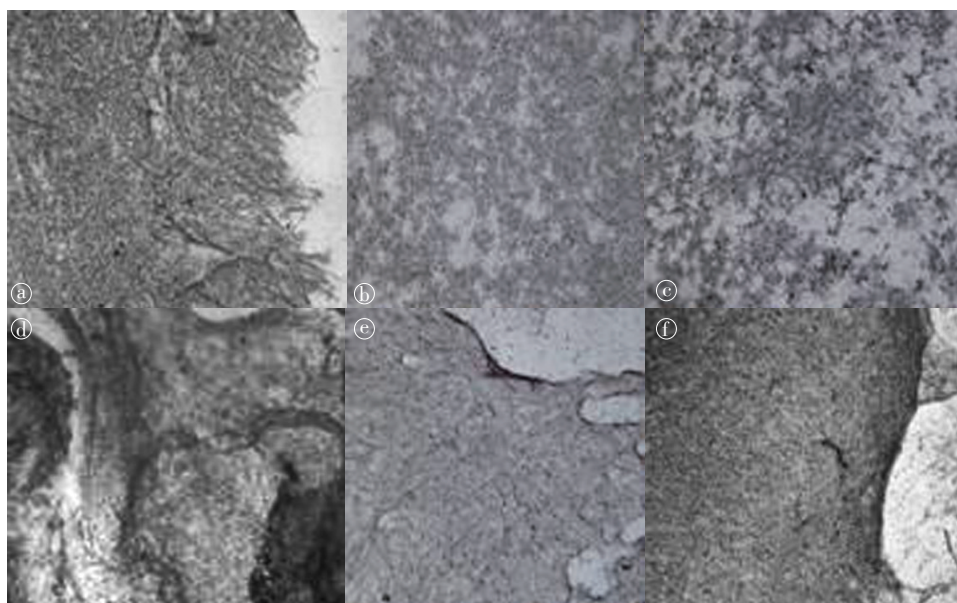
2.2 抑制生物膜形成的MIC测定 连续与不同浓度的银翘散煎剂和阿奇霉素作用7d后硅胶片银染及光学显微镜拍照观察,在银翘散煎剂浓度为500.0g/L、阿奇霉素浓度为250.0mg/L时,可观察有抑制铜绿假单胞菌生物膜形成的作用,黑色絮状物较阳性对照明显减少。随着浓度的降低,生物膜形成越来越多,黑色絮状物增加明显,见图2。

2.3 银翘散煎剂和阿奇霉素联合用药的MIC 银翘散煎剂和阿奇霉素联合用药7d后,银染法鉴定观察,抑制铜绿假单胞菌生物膜形成的MIC分别为125.0g/L和62.5mg/L,见表1。

表1 银翘散煎剂、阿奇霉素抑制PA生物膜形成的MIC  
Table 1 MIC of Yinqiao powder and azithromycin inhibiting biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*

药物 Drugs	协同前 MIC	协同后 MIC
	MIC before synergism	MIC aAfter synergism
银翘散煎剂(g/L) Yinqiao powder	500.0	125.0
阿奇霉素(mg/L) Azithromycin	250.0	62.5

根据表1中的结果计算分级抑菌浓度指数(FIC)为0.5,表明银翘散和阿奇霉素具有协同抗铜绿假单胞菌生物膜形成的作用(两药联合使用,当FIC≤0.5时,表示二者有协同作用)。



注:a~f浓度分别为阳性对照,500,250,125,62.5,31.25g/L。Note: a~f are positive control, 500, 250, 125, 62.5, 31.25g/L.

图2 不同浓度银翘散煎剂对PA生物膜形成的抑制作用。

Fig.2 Inhibition effect of different concentrations of Yinqiao powder on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

### 3 讨论

生物膜形成是铜绿假单胞菌耐药的重要机制之一,也是许多感染性疾病反复发作和难以控制的主要原因<sup>[5]</sup>。目前临床多用三代头孢类或碳青霉烯类抗生素治疗铜绿假单胞菌的感染,但存在价格昂贵和副作用较大等问题,且对黏液性铜绿假单胞菌感染治疗效果不明显。阿奇霉素等大环内酯类抗生素对革兰阳性菌的抗菌作用较强,而铜绿假单胞菌一般对其耐药。但有研究显示<sup>[6]</sup>,大环内酯类药物可以抑制细菌产生糖蛋白复合物,从而抑制生物膜的生长。故针对CF和DPB患者多会联合使用大环内酯类药物以改善症状,延长患者的生命<sup>[7-8]</sup>。

清热解毒类中药具有广谱的抗菌作用,并且具有副作用小,不易产生耐药性等优点,药源丰富,具有开发潜能<sup>[9]</sup>。银翘散主方有连翘、金银花、苦桔梗、薄荷、淡竹叶、生甘草、荆芥穗、淡豆豉、牛蒡子等,均有较广的抗菌作用。本实验观察银翘散煎剂在浓度为500.0g/L时能解除生物膜的屏障作用,显微镜下观察也提示该煎剂对铜绿假单胞菌生物膜的发育有明显的干预作用,有利于抗生素的治疗和免疫因素的杀菌,起到与大环内酯类抗生素类似的抑膜作用,为中医药治疗相关疾病提供依据。

实验还显示银翘散与阿奇霉素有很好的抑制生物膜形成的协同作用,由此可以初步判断清热解毒类的中药汤剂与抗生素配伍使用,可以提高临床疗效,中药对细菌可起到一定的增效作用,提高耐药菌对抗生素的敏感性,使抗生素最大限度的杀灭细菌。因

此,在中医理论指导下进行辨证论治,随证加减,可以避免细菌耐药性的产生,或是对耐药菌有增敏或逆转作用。

### 参考文献

- [1] Antunes L C M, Ferreira R B R, Buckner M M C, et al. Quorum sensing in bacterial virulence[J]. Microbiology, 2010, 156(8): 2271-2282.
- [2] 朱小明,杨家卿,张昌峰,等.黄连解毒汤抗铜绿假单胞菌生物被膜及与阿奇霉素协同抗菌作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11): 155-158.
- [3] 袁秀丽,吕嘉彬,程慧娟.金银花水煎液抗绿脓杆菌生物膜作用及其与庆大霉素的协同作用[J].西北药学杂志,2010,25(3):201-203.
- [4] 栾耀芳,孔祥山,吴斌,等.复方银翘散对五种常见耐药菌的体外敏感性研究[J].山东医药,2011,51(43):66-67.
- [5] 徐笑洋,邱晨.铜绿假单胞菌生物膜耐药的研究进展[J].广东医学,2012,33(10): 1509-1513.
- [6] Lu T K, Collins J J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(27): 11197-11202.
- [7] Yang L, Rybtke M T, Jakobsen T H, et al. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009, 53(6): 2432-2443.
- [8] Martin C A, Hoven A D, Cook A M. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2008, 27(8): 635-642.
- [9] 郑金喜,苏显中,王河清,等.中草药体外抑菌作用的研究进展[J].中国医药生物技术,2009,4(4):295-298.

收稿日期:2015-04-03 编辑:符式刚