

苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜作用初探

官妍* 马越 程惠娟 汪长中 谢萌 张爽 王艳

(安徽中医学院 安徽 合肥 230038)

摘要: 通过中药有效成分苦参碱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引起的相关感染提供新的治疗途径。利用 XTT 减低法评价苦参碱对表皮葡萄球菌初始粘附及生物被膜内细菌代谢的影响, 镜下观察该药对表皮葡萄球菌生物被膜的形态学影响。结果表明: 苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜菌的 $SMIC_{50}$ 和 $SMIC_{80}$ 分别为 62.5 mg/L 和 500 mg/L; 1 000 mg/L 浓度的苦参碱对表皮葡萄球菌早期粘附有抑制作用; 250 mg/L 浓度的苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜的形态有显著影响。因此可见, 苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜的形成与粘附均有抑制作用。

关键词: 生物被膜, 表皮葡萄球菌, 苦参碱

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

GUAN Yan* MA Yue CHENG Hui-Juan WANG Chang-Zhong XIE Meng
ZHANG Shuang WANG Yan

(Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230038, China)

Abstract: A new therapeutic approach for *Staphylococcus epidermidis* biofilm-associated infections was provided by the study of active ingredient of Chinese medicine matrine on *S. epidermidis* biofilm inhibition. XTT reduction assay was used to evaluate matrine on the initial adhesion of *S. epidermidis* and biofilm metabolism, and microscope was applied to observe biofilm morphology. The results showed that $SMIC_{50}$ and $SMIC_{80}$ of matrine against *S. epidermidis* biofilms were 62.5 mg/L and 500 mg/L respectively, 1 000 mg/L of matrine inhibited the early adherence of *S. epidermidis*, and 250 mg/L of matrine had a significantly inhibitory effect on *S. epidermidis* biofilm morphology. The study demonstrated that matrine could inhibit *S. epidermidis* biofilm formation and adhesion.

Keywords: Biofilm, *Staphylococcus epidermidis*, Matrine

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(No. KJ2010A214)

* 通讯作者: Tel: 86-551-5169204; ✉: guanyan0726@sina.com

收稿日期: 2010-07-12; 接受日期: 2010-11-01

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, Se) 是人体皮肤和黏膜的主要共生菌,也是一种常见的条件致病菌。近年来随着临床上插管、人工瓣膜、透析等医疗技术和一次性材料使用的增多,表皮葡萄球菌现已成为医院感染的重要致病菌,而表皮葡萄球菌对常见抗菌药物耐药率已成为医院感染和临床治疗的棘手问题^[1]。研究表明,生物被膜(Biofilm)是细菌产生多聚复合物基质将自身包绕,粘附于无活性物体或活体表面,形成的有一定结构的细菌群体;它可以抵抗宿主免疫力和抗生素杀菌,被膜内细菌容易对抗生素产生广泛的耐药性,造成感染难以治愈,反复发作^[2]。因此,以表皮葡萄球菌生物被膜为对象,从生物被膜及表皮葡萄球菌的生物学特征出发,进行定向药物研发,正成为解决表皮葡萄球菌耐药性及其生物被膜相关感染的研究热点。但有关中药及其有效成分对表皮葡萄球菌生物被膜的形成与影响的研究很少报道;苦参碱作为常用中药苦参等豆科植物的有效成分,对于治疗慢性乙型肝炎、心血管疾病、抗病毒、抗肿瘤、抗炎免疫和抗虫方面有很好的疗效。本研究通过在体外建立表皮葡萄球菌生物被膜模型,观察苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜的作用,为中药治疗表皮葡萄球菌生物被膜相关感染提供科学依据。

1 实验材料

1.1 菌株

安徽医科大学第一附属医院检验科 2009 年 4-11 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 (Polysaccharide intercellular adhesion, 胞间多糖黏附素)阳性菌株,从这 16 株中选出 1 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 培养基

血琼脂平板(BAP: 100 mL 血/L 营养琼脂),刚果红琼脂(刚果红 0.8 g/L, 脑心浸液干粉 37 g/L, 葡萄糖 5 g/L, 琼脂 20 g/L, 氯化钠 40 g/L),胰蛋白胨大豆肉汤(TSB: 青岛高科海博生物技术有限公司)。

配制培养基所用药品均为国产分析纯。

1.3 药品与试剂

苦参碱(中国药品生物制品检定所, 100247-199601),红霉素标准品(中国药品生物制品检定所,批号: 130307),XTT(合肥博美生物技术有限公司),PBS(实验室自配),结晶紫(天津市光复精细化工研究所),维生素 K₃(Alexis 公司)。

1.4 实验设备

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

2 中药有效成分苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜的作用

2.1 筛选实验菌株

参照文献[3]的方法并进行改良,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,经 37 °C 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,选出与表皮葡萄球菌 ATCC 12228 (不产膜株)有显著差别($P < 0.001$)的 Se738 为实验菌株。

2.2 表皮葡萄球菌生长量测定

参照文献[4]将 Se738 接种于 TSB 中,于 37 °C 摇床增菌 18 h,菌液用 TSB 稀释成浊度为 0.5 麦氏单位的菌悬液,取 100 μ L 接种于 96 孔板中 37 °C 培养 0、1、2、4、6、8、24 h(每个时间段设 12 个复孔),于 650 nm 处分别测定其 OD 值,弃去培养基与悬浮菌,蒸馏水清洗 3 次,56 °C 干燥 1 h,0.4%结晶紫染色 2 min,蒸馏水清洗 3 次,于 650 nm 处分别测定其 OD 值。

2.3 苦参碱等对表皮葡萄球菌粘附作用实验

参照文献[5]将浊度为 0.5 麦氏单位的菌液取 100 μ L 接种入 96 孔板中,于 37 °C 分别培养 0、1、2、4 h,弃去培养基与悬浮菌,PBS 清洗 3 次,加入

10 倍连续稀释(1 000 mg/L, 100 mg/L, 10 mg/L)的苦参碱溶液(每个浓度设 8 个复孔), 再于 37 °C 培养 24 h, 加入 XTT 溶液(林格液稀释为 0.5 g/L, 0.22 μ m 孔径的滤膜过滤除菌, 临用前加入 VK₃) 100 μ L, 37 °C 避光培养 2 h, 于 650 nm 处测其 OD 值。另设空白对照孔(只加培养基)、阴性对照孔(未加药的生物膜生长对照)和阳性对照孔(10 倍稀释加入红霉素)。

2.4 苦参碱等对表皮葡萄球菌生物被膜菌的 SMIC 测定

参照文献[6-7]并改进将浊度为 0.5 麦氏单位的菌液取 100 μ L 接种于 96 孔板中, 37 °C 培养 24 h, PBS 清洗 3 次, 对倍稀释(1 000、500、250、125、62.5、31.25 mg/L)加入苦参碱(每个浓度设 8 个复孔), 继续于 37 °C 培养 48 h, 加入 100 μ L XTT 溶液, 37 °C 避光培养 2 h, 于 650 nm 处测其 OD 值。另设空白对照孔(只加培养基)、阴性对照孔(未加药的生物膜生长对照)和阳性对照孔(对倍稀释加入红霉素)。

2.5 苦参碱等对表皮葡萄球菌生物被膜形态结构影响的观察

参照文献[8]将预先灭菌的盖玻片浸在浊度为 0.5 麦氏菌液的培养基中, 分别培养 6 h、1 d、3 d 和 7 d(每天换 1 次菌液), 使之形成粘附或生物被膜模型, 再分别以 250 mg/L 苦参碱、125 mg/L 红霉素为给药浓度, 对各模型分别作用 6 h、1 d、3 d 和 7 d(每天换 1 次药液), 用结晶紫染色法光镜观察以及镀银染色法电镜观察各模型形态的变化, 根据其形态结构的变化判断药物的作用效果。

2.6 数据处理

采用 SPSS 11.0 for Windows 软件处理, 对相关数据进行统计分析。

3 实验结果

3.1 表皮葡萄球菌生长量测定

随着培养时间的增加, 菌液中细菌生长量一直呈增加趋势, 而粘附在板上的细菌生长量变化不大(图 1)。

3.2 苦参碱等对表皮葡萄球菌粘附功能的影响

与未加药的对照孔相比较, 1 000 mg/L 苦参碱在 0、1、2、4 h 内对表皮葡萄球菌的粘附均有抑制

作用(与阴性对照孔比较 $P < 0.01$), 而其他浓度的苦参碱对表葡的粘附抑制作用不明显。1 000 和 100 mg/L 红霉素在 0、1、2、4 h 内对表皮葡萄球菌的粘附均有抑制作用(与阴性对照孔比较 $P < 0.01$, 图 2 和 3)。

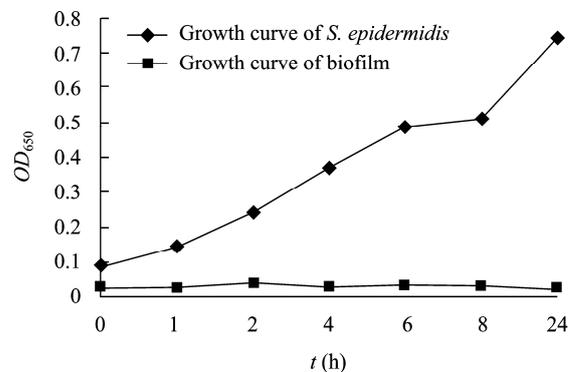


图 1 表皮葡萄球菌及其生物被膜生长量曲线图
Fig. 1 Growth curve of *S. epidermidis* and its biofilm

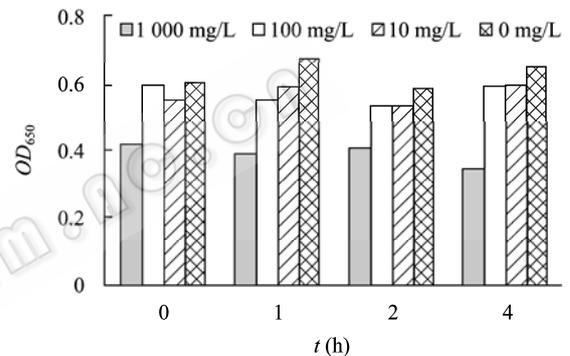


图 2 不同浓度苦参碱对表皮葡萄球菌粘附性的影响
Fig. 2 Effect of matrine at different concentrations on adherent *S. epidermidis* cells

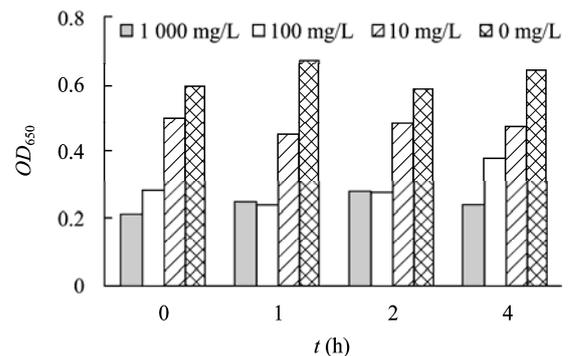


图 3 不同浓度红霉素对表皮葡萄球菌粘附性的影响
Fig. 3 Effect of erythromycin at different concentrations on adherent *S. epidermidis* cells

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

3.3 苦参碱等对表皮葡萄球菌生物被膜菌 SMIC

苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜菌的 SMIC₅₀ (与阴性对照相比, 抑制生物被膜菌活性 50% 的药物浓度) 为 62.5 mg/L, SMIC₈₀ (与阴性对照相比, 抑制生物被膜菌活性 80% 的药物浓度) 为 500 mg/L。红霉素对表皮葡萄球菌生物被膜菌的 SMIC₈₀ < 31.25 mg/L (图 4 和 5, 以阴性对照组的 OD 值为 100%)。

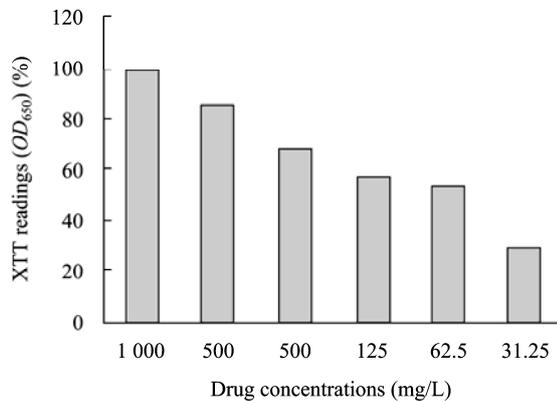


图 4 不同浓度苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响

Fig. 4 Effect of matrine at different concentrations on *S. epidermidis* biofilm formation

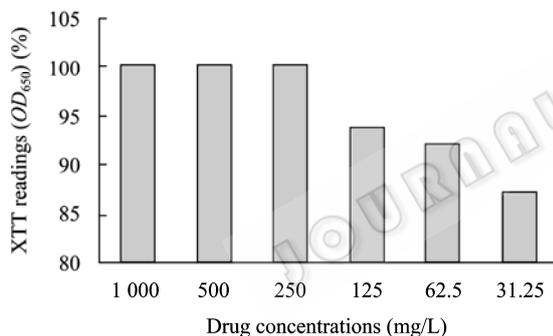


图 5 不同浓度红霉素对表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响

Fig. 5 Effect of erythromycin at different concentrations on *S. epidermidis* biofilm formation

3.4 镜下观察苦参碱等对表皮葡萄球菌生物被膜形态结构的影响

通过光学显微镜、扫描电子显微镜观察可以看出, 苦参碱使表皮葡萄球菌生物被膜形态结构发生明显变化, 对表皮葡萄球菌生物被膜形成产生明显的抑制作用(图 6 为光学显微镜下观察结果, 图 7 为

扫描电子显微镜下观察结果)。

4 讨论

苦参碱作为常用中药苦参等豆科植物的有效成分, 对于治疗慢性乙型肝炎、心血管疾病、抗病毒、抗肿瘤、抗炎免疫和抗虫方面有很好的疗效^[9], 但其对表皮葡萄球菌生物被膜的作用此前未见报道。

细菌生物被膜(Bacterial biofilm)是细菌产生多聚复合物基质将自身包绕, 粘附于无活性物体或活体表面, 形成的有一定结构的细菌群体。生物被膜的形成包括附着、粘附、早期 BBF、成熟 BBF 和散播 5 个过程。生物被膜中细菌对抗菌药物高度耐药并可逃避机体免疫的免疫作用导致感染迁延不愈, 成为生物被膜相关感染^[10]。

此前有报道证实^[11-13], 红霉素对表皮葡萄球菌生物被膜具有较好的抑制作用, 故本实验采用红霉素做为对照, 证实实验方法正确有效。本实验采用 ATCC 12228 为不产膜的对照株, 经过血琼脂平板和刚果红琼脂平板的分离培养及生长量测定, 从 45 株临床表皮葡萄球菌中选出 Se738 为实验菌株。粘附和 SMIC 测定中使用的 XTT 法, 在不破坏生物被膜结构的条件下能检测出生物被膜中菌细胞的活性。

在生长量测定实验中, 可以看出在表皮葡萄球菌在 24 h 内的生长量一直呈增长趋势, 而在 96 孔培养板上的细菌生长量基本不变。通过镜下观察的照片加以佐证, 得出结论: 前 6 h 内, 表皮葡萄球菌处于附着与粘附阶段, 至 24 h 时, 生物被膜初步长成, 而 3 d 时生物被膜生长基本成熟, 据此设计粘附实验和 SMIC 实验。酶标仪测定的 OD 值表明 1000 mg/L 浓度的苦参碱溶液对表皮葡萄球菌地粘附具有明显的抑制作用; 而苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜菌的 SMIC₅₀ 和 SMIC₈₀ 分别为 62.5 mg/L 和 500 mg/L, 显示出苦参碱具有抗表皮葡萄球菌生物被膜内细菌代谢的作用。镜下观察表明, 在表皮葡萄球菌的附着粘附阶段、成膜之中和成膜之后苦参碱对其都有明显的作用, 或阻止细菌粘附(图 6B), 或影响成膜(图 6E、图 6H), 或在成膜后破坏膜表面结构(图 7B)。以上结果均提示苦参

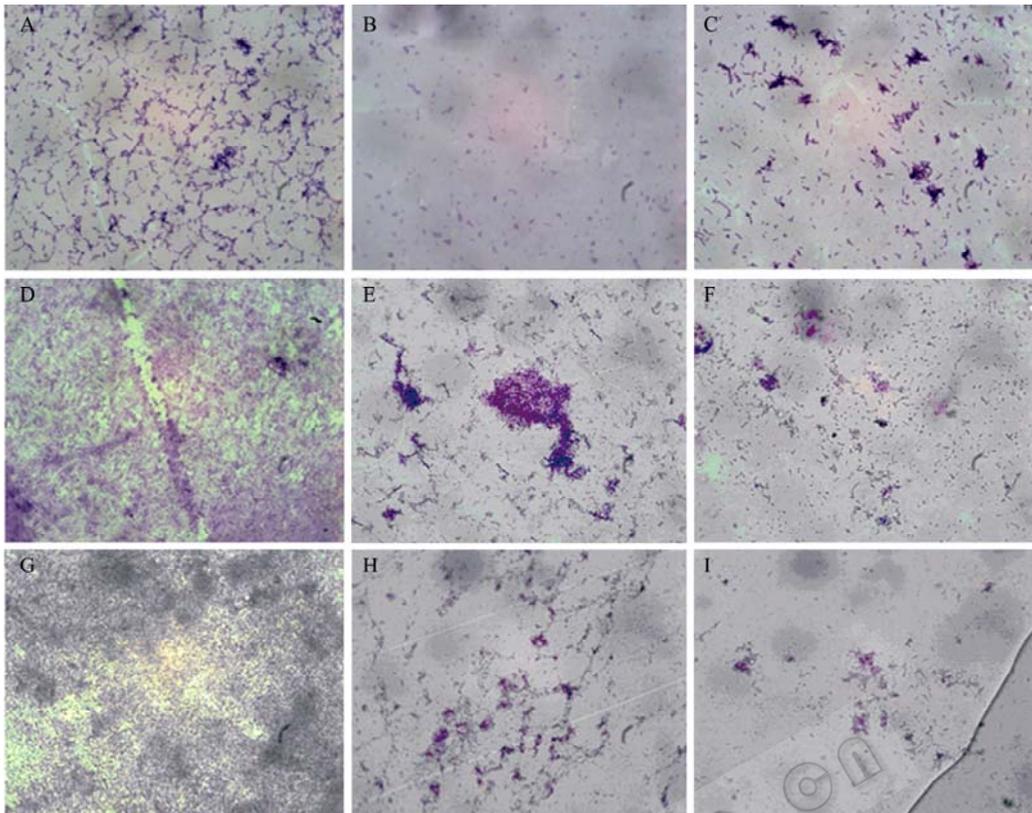


图 6 结晶紫染色观察 Se738 不同作用条件下的生长状况($\times 1\ 000$)

Fig. 6 Growth of Se738 strain under different conditions observed by crystal violet staining($\times 1\ 000$)

注: A: TSB 培养 6 h 的表皮葡萄球菌(对照); B: 250 mg/L 苦参碱作用培养 6 h 的表皮葡萄球菌; C: 125 mg/L 红霉素作用培养 6 h 的表皮葡萄球菌; D: TSB 培养 1 d 的表皮葡萄球菌(对照); E: 250 mg/L 苦参碱作用培养 1 d 的表皮葡萄球菌; F: 125 mg/L 红霉素作用培养 1 d 的表皮葡萄球菌; G: TSB 培养 3 d 的表皮葡萄球菌(对照); H: 250 mg/L 苦参碱作用培养 3 d 的表皮葡萄球菌; I: 125 mg/L 红霉素作用培养 3 d 的表皮葡萄球菌.

Note: A: *S. epidermidis* cultured in TSB media for 6 h (control); B: *S. epidermidis* treated with 250 mg/L matrine for 6 h; C: *S. epidermidis* treated with 125 mg/L erythromycin for 6 h; D: *S. epidermidis* cultured in TSB media for 1 d (control); E: *S. epidermidis* treated with 250 mg/L matrine for 1 d; F: *S. epidermidis* treated with 125 mg/L erythromycin for 1 d; G: *S. epidermidis* cultured in TSB media for 3 d (control); H: *S. epidermidis* treated with 250 mg/L matrine for 3 d; I: *S. epidermidis* treated with 125 mg/L erythromycin for 3 d.

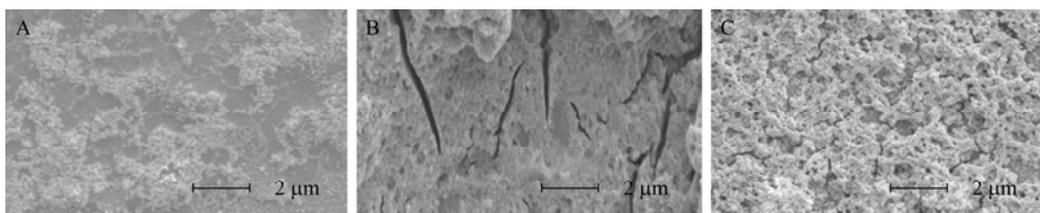


图 7 镀银染色观察 Se738 不同作用条件下的生长状况 ($\times 20\ 000$)

Fig. 7 Growth of Se738 strain under different conditions observed by silver staining ($\times 20\ 000$)

注: A: TSB 培养 7 d 的表皮葡萄球菌(对照); B: 250 mg/L 苦参碱作用培养 7 d 的表皮葡萄球菌; C: 125 mg/L 红霉素作用培养 7 d 的表皮葡萄球菌.

Note: A: *S. epidermidis* cultured in TSB media for 7 d (control); B: *S. epidermidis* treated with 250 mg/L matrine for 7 d; C: *S. epidermidis* treated with 125 mg/L erythromycin for 7 d.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

有效成分苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜有显著的作用,在治疗临床由表皮葡萄球菌生物被膜引起的相关感染方面有一定的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 兰琳. 医院感染凝固酶阴性葡萄球菌耐药性研究[J]. 中国实用医学, 2008, 3(25): 32-33.
- [2] 刘晓琰, 施安国. 细菌生物被膜的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 18(4): 302-305.
- [3] 吴晓燕, 陈劲松, 倪佩翔. 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): 1112-1113.
- [4] 枉前, 孙凤军, 夏培元. 临床分离表皮葡萄球菌的大环内脂耐药性与生物膜形成能力、icaA 基因型的关系[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(22): 2252-2254.
- [5] 汪长中, 程惠娟, 官妍, 等. 苦参碱对体外白念珠菌生物膜抑制作用[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(12): 1491-1492.
- [6] 叶应妩, 李健斋, 王玉琛主编. 临床实验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1804-1806.
- [7] 李睿明, 雷朝霞. 细菌耐药性对抗策略——中药延缓、逆转细菌耐药性, 治疗耐药细菌感染的研究[J]. 医学与哲学: 临床决策论坛版, 2006, 27(8): 45-47.
- [8] 佟金平, 王镇山, 王燕, 等. 银染法观察葡萄球菌生物被膜. 大连医科大学学报, 2009, 31(5): 548-549.
- [9] 王浴生, 邓文龙, 薛春生主编. 中药药理与应用[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 972-977.
- [10] 方向群, 刘又宁. 细菌生物被膜与难治性感染性疾病[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(3): 186-187.
- [11] 贾宁, 徐志凯, 索继江, 等. 引发医院感染表皮葡萄球菌生物被膜的检测[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 88-91.
- [12] 贾宁, 安群星, 徐志凯, 等. 表皮葡萄球菌生物被膜对红霉素渗透性的研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 841-845.
- [13] 贾宁, 林茂虎, 徐志凯, 等. 表皮葡萄球菌生物被膜内细菌对红霉素敏感性的检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(8): 923-925.
- [14] Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development[J]. Nature, 2002, 417(6888): 552-555.
- [15] Kolonitsiou F, Syrokou A, Karamanos NK, et al. Immunoreactivity of 80-kD peptidoglycan and teichoic acid-like substance of slime producing *S. epidermidis* and specificity of their antibodies studies by an enzyme immunoassay[J]. J Pharm Biomed Anal, 2001, 24(3): 429-436.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定,计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体),不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下,希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C-5 °C 不可写成 3-5 °C; 3%-6%不可写成 3-6%等。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>