

复方白玉散对金黄色葡萄球菌生物被膜的体外抑制作用研究

姚孝明 刘晓蓉 吴娟 梅国勇 杨婉薇 葛云霞

(南京中医药大学附属中西医结合医院、江苏省中医药研究院, 江苏南京 210028)

摘要 目的:研究复方白玉散对金黄色葡萄球菌生物膜形成的体外抑制作用。方法:采用微量肉汤二倍稀释法测定复方白玉散作用于标准菌株ATCC29213和临床分离33株金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC),用结晶紫染色法检测复方白玉散对生物膜最小抑膜浓度(sMIC)。结果:复方白玉散对标准菌株ATCC29213和强成膜株SA17的MIC分别为25mg/mL和50mg/mL, MBC分别为50mg/mL和100mg/mL。标准菌株ATCC29213为生物膜阳性菌株,并且33株临床分离S.aureus中,有25株为生物膜阳性菌株,生物膜的形成为75.6%。复方白玉散对标准菌株ATCC29213的sMIC₅₀为1.6mg/mL, sMIC₈₀为6.3mg/mL,对强成膜株SA17的sMIC₅₀为3.2mg/mL, sMIC₈₀为6.3mg/mL。结论:复方白玉散能抑制金黄色葡萄球菌生物膜的生成,并且具有一定的抑菌和杀菌作用。

关键词 复方白玉散 金黄色葡萄球菌 生物被膜

中图分类号 R289.52

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2017)09-0073-03

生物被膜(biofilm, BF)是细菌为适应自然环境在固态表面生长时所采取的一种保护性的群体生活方式。细菌生物被膜广泛存在于自然界中,其中金黄色葡萄球菌是较易形成生物被膜的菌种之一^[1],也是伤口感染的首要病原菌^[2]。复方白玉散是名老中医刘再朋教授治疗难愈性创面的经验方,前期研究发现其在慢性口腔溃疡和难愈性创面治疗中疗效显著^[3-4]。本研究旨在观察复方白玉散在体外对金黄色葡萄球菌抑菌作用和对生物被膜形成的抑制作用,为临床治疗提供理论依据。

1 实验材料

1.1 菌株 金黄色葡萄球菌标准菌株ATCC29213,购自卫生部临床检验中心;临床菌株33株S.aureus(菌株编号SA1~SA33)为2014至2015年本院临床创面分泌物分离所得,经西门子Walkaway 40细菌鉴定仪鉴定,并剔除同一患者分离到的重复菌株。

1.2 复方白玉散药液 复方白玉散超细粉剂由本院中药制剂中心提供。复方白玉散以煅石膏、白芷、白及等中药分别研成超细粉,混匀,加热灭菌4h备用。通过“超细”处理,可增加中药的溶出率和生物利用度,保留中药的挥发活性成分,增强中药的药效。准确称取20g复方白玉散超细粉剂置于烧杯内,加水200mL,置于室温下浸泡1~2h后加热煮沸30min,连续煎煮2次,冷却,过滤,合并煎煮液,浓缩至20mL,

使药液含原药材达1g/mL,置于4℃冰箱内保存备用。

1.3 试剂与仪器 Walkaway 40细菌鉴定仪(Siemens, GER);96孔细胞培养板(Corning, USA);酶联免疫分析仪(Biotek, USA);胰蛋白胍大豆肉汤(TSB, 青岛日水生物技术有限公司, 20150522);结晶紫(Sigma, USA)。

2 实验方法

2.1 菌种活化与菌悬液制备 将冻干保存的金黄色葡萄球菌接种于血琼脂培养基,37℃过夜培养,取直径>1mm的菌落一环于无菌TSB培养基中,37℃条件下振荡培养至对数生长期。将复苏24h的菌种接种于TSB培养基中,37℃条件下培养24h,置于超声仪上重新使菌团分散均匀,参照麦氏比浊法,用pH值为7.3的无菌磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS)调整菌悬液细菌密度约为 1×10^8 CFU/mL。

2.2 结晶紫染色法检测生物被膜 置一定量菌悬液于96孔板中,加入TSB培养基,盖上盖子,在37℃条件下恒温恒湿培养。培养72h后弃去96孔板中的培养物,用200μL无菌磷酸盐缓冲液(pH7.3)冲洗3次,去除培养基和浮游状态的细菌。在孔中加入甲醇200μL加盖静置15min,吸除甲醇后在30℃环境下自然风干,固定吸附紧密的细菌。在每个孔中加入200μL结晶紫(1%结晶紫溶液),静置染色20min后弃去染色液,无菌磷酸盐缓冲液(pH7.3)冲

基金项目:江苏省自然基金项目(BK20161606);江苏省中医药局科研项目(YB2015043)

洗直至无色,晾干。在染色的孔中加入200 μ L、体积分数为95%的乙醇脱色,用空白孔以200 μ L TSB培养基作为空白调零,测定595nm波长处光密度值OD_{595nm},每株菌均3个复孔,取平均值。判断标准为:以OD_{595nm}<0.11为阴性菌株,0.11 $\leq$ OD_{595nm}<0.5为弱成膜菌株,0.5 $\leq$ OD_{595nm}<1.5为中成膜菌株,OD_{595nm} $\geq$ 1.5为强成膜菌株。最终选择生物被膜强阳性菌株SA17作为实验菌^[5-6]。

2.3 药物最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)测定 本实验以标准菌株ATCC29213和强成膜分离株SA17为实验菌。采用微量肉汤二倍稀释法测定复方白玉散作用于SA25(阴性对照)及SA17的MIC^[7]。将过夜菌用TSB稀释为0.5MCF,每孔加入菌悬液180 μ L,用TSB将96孔板中复方白玉散从1000mg/mL稀释至15.6mg/mL,7个梯度,每孔20 μ L加入菌悬液中,轻轻振荡混匀。设置阴性对照(只含TSB菌液)、空白对照管(只加TSB),37 $^{\circ}$ C培养24h后观察结果。判断依据:药物组的溶液与阴性对照一样清晰透明的为该药的MIC。将与阴性对照一样清晰透明的药物组溶液再接种血琼脂培养基培养24h,无细菌生长的含药量最少的即为该药对实验菌的MBC。

2.4 复方白玉散最小抑膜浓度(sMIC)测定 参照文献[8]取0.5MCF的标准菌株ATCC29213和强成膜分离株SA17菌株的TSB菌液180 μ L接种到96孔板中,每孔加入20 μ L用TSB为稀释液对倍连续稀释的复方白玉散。另设空白对照孔(只加培养基)、阴性对照孔(只加菌液不加药物),37 $^{\circ}$ C恒温培养72h,采用结晶紫染色法检测。生物被膜抑制率的测定采用公式:(OD阴性对照组-OD药物组)/(OD阴性对照组-OD空白组) $\times$ 100%。

2.5 统计学方法 应用SPSS 19.0统计软件,组间比较采用 t 检验,结果用($\bar{x} \pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 结晶紫染色法检测标准菌株ATCC29213和33株临床菌株生物被膜 结果标准菌株ATCC29213为生物被膜阳性菌株,并且33株临床分离S.aureus中有25株为生物被膜阳性菌株,即生物被膜的形成率为75.6%,其中编号SA17的为强成膜菌株。

3.2 复方白玉散对标准菌株ATCC29213和强成膜株SA17的MIC和MBC测定结果 见表1。

表1 复方白玉散对标准菌株ATCC29213和强成膜株SA17的MIC和MBC结果 mg/mL

指标	标准菌株 ATCC29213	强成膜株 SA17
MIC	25	50
MBC	50	100

3.3 复方白玉散对SA17生物被膜的sMIC测定结

果 复方白玉散对标准菌株ATCC29213和强成膜株SA17的sMIC₅₀(与阴性对照相比,抑制生物被膜菌活性50%的药物浓度)分别约为1.6mg/mL和3.2mg/mL,sMIC₈₀(与阴性对照相比,抑制生物被膜菌活性80%的药物浓度)均约为6.3mg/mL,与阴性对照组比较差异有统计学意义,见表2。结果显示,复方白玉散能够抑制生物被膜的形成,且抑制率随药物浓度的升高而升高。

表2 复方白玉散对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的抑制作用

药物浓度 (mg/mL)	标准菌株 ATCC29213		强成膜株 SA17	
	OD 值	抑制率	OD 值	抑制率
100	0.196 $\pm$ 0.046**	98.6	0.198 $\pm$ 0.018**	98.6
50	0.212 $\pm$ 0.048**	95.5	0.228 $\pm$ 0.023**	96.6
25	0.223 $\pm$ 0.016**	93.5	0.239 $\pm$ 0.034**	95.9
12.5	0.259 $\pm$ 0.043**	86.8	0.390 $\pm$ 0.065**	86.0
6.3	0.298 $\pm$ 0.148**	79.5	0.484 $\pm$ 0.098**	79.8
3.2	0.333 $\pm$ 0.097**	72.9	0.818 $\pm$ 0.100**	58.0
1.6	0.489 $\pm$ 0.146*	43.8	1.388 $\pm$ 0.160	20.8
阴性对照组	0.723 $\pm$ 0.188	-	1.706 $\pm$ 0.152	-
空白组	0.188 $\pm$ 0.016	-	0.176 $\pm$ 0.007	-

注:与阴性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

4 讨论

研究表明,难愈性创面中金黄色葡萄球菌检出率最高,其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)占金黄色葡萄球菌的比例高达76.09%。MRSA具有多重耐药性,给临床治疗和医院感染控制带来了困难^[9]。近年来各种新型敷料也用于治疗本病但成本较高且患者易出现局部过敏等不适反应^[10],而中药治疗具有药效长、来源广、价格低廉、毒副作用小、较少出现耐药等优点。本实验通过结晶紫染色法半定量检测细菌生物被膜,证实标准菌株ATCC29213为生物被膜阳性菌株,且33株临床分离S.aureus中,有25株为生物被膜阳性菌株,即生物被膜的形成率为75.6%(这与文献报道80%的临床感染与细菌生物被膜的形成有关基本一致),并在实验中筛选出强成膜菌株SA17为实验菌株。

复方白玉散由白芷、白及、煅石膏、冰片等药物组成。方中白芷为君,性温,味辛、微苦,具有活血生肌之功;白及、煅石膏为臣,白及苦涩微寒,收敛止血、消肿生肌,煅石膏甘辛涩寒,能收湿生肌、敛疮止血,二者辅白芷以生肌敛疮;取冰片为佐,以清热散毒敛疮。前期研究发现,复方白玉散可有效上调口腔黏膜EGFR、VEGF的表达,增加微血管密度,具有抑制体表脓肿及口腔黏膜炎症反应的作用^[3, 11]。本研究观察了复方白玉散对S.aureus生长及生物被膜的抑制作用,结果表明,复方白玉散对S.aureus具有一定的抑菌和杀菌作用,更是在较低药物浓度水平即对S.aureus

(下转第77页)

疗效间成正相关^[8],本实验结果显示并非如此。我们分析认为,捏脊调节具有自限性,捏脊疗效并非随着刺激强度的增强一直升高,达到一定刺激量时捏脊疗效可能会随强度升高而下降或不变,本次实验显示捏脊20遍可能是对卫气虚SD大鼠的最佳刺激强度。

中医理论认为,脊背部为诸阳经交会之地,捏脊时主要涉及了督脉和两侧膀胱经,内连脏腑,外达四肢,具有疏通经络、调整气血分布、调节阴阳平衡的作用,使气血通畅、脏器和谐,提高机体免疫能力。另外,源于脾胃的卫气和组织液、淋巴液等血管外体液循环系统在物质基础、循行分布和功能作用等方面十分类似,我们推测捏脊疗法-健脾益卫-淋巴循环三者之间有着密切的联系^[9]。多年来的临床和实验研究主要集中在捏脊疗法对消化系统的调节作用上,其机理研究往往集中在神经和内分泌等方面,从免疫系统入手的研究较少^[10]。本实验从免疫方面证实捏脊疗法的健脾益卫功能,并确定最佳捏脊次数,为下一步探讨基于淋巴系统的捏脊疗法健脾益胃机制研究建立稳定的效应平台。

参考文献

- [1] 周运峰,焦凡,雷洋.捏脊疗法治疗小儿脾胃虚弱证的机理探讨[J].中医学报,2011,26(6):760.
- [2] 穆蕊.改良捏脊疗法对跆拳道运动员抗疲劳能力、免疫功能及血流变的影响[D].西安:西安体育学院,2013.
- [3] 贾琳,王亚利,张明全,等.卫气虚证大鼠模型的建立及玉屏风散的反证效果[J].中医杂志,2015,56(8):690.
- [4] 崔瑾,向开维,吴高鑫.捏脊对厌食大鼠下丘脑和血浆CCK-8的影响[J].四川中医,2008,26(10):13.
- [5] 区永欣,邱杰钊,王洪琦,等.卫气理论的实验研究[J].广州中医学院学报,1992(3):135.
- [6] 章恪.卫气:免疫细胞的中医学表达形式[J].湖北中医杂志,2001,23(3):3.
- [7] 刘茜,刘向国,武松.肺气肿肺气虚证模型大鼠胸腺指数、脾脏指数变化的实验研究[J].甘肃中医学院学报,2006,23(1):20.
- [8] 李珍,唐勇,林小兰.捏脊疗法对大鼠血清中IL-2和免疫球蛋白的影响[J].新中医,2012,44(5):131.
- [9] 李忠正,郭义,郭永明.浅析卫气与血管外体液循环系统的关系[J].中医药学报,2010,38(4):1.
- [10] 杨小平.捏脊疗法益气健脾作用的临床探讨[J].按摩与导引,2000,16(1):13.

第一作者:李青敏(1993—),女,硕士研究生,针灸推拿学专业。

通讯作者:李忠正,博士,讲师。lizzh2008@163.com

收稿日期:2017-05-10

编辑:吴宁

(上接第74页)

生物被膜的形成有抑制作用,且随着药物浓度的增加,对生物被膜的抑制作用有增强的趋势。

复方白玉散临床以粉剂形式喷洒于创面,本实验为了研究便利,采用的是其水煎煮浓缩溶液,可能存在一定的差异,但实验的结果仍然为复方白玉散的临床应用提供了一定的参考依据,具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 胡晓丰,史云,戚丽华,等.金黄色葡萄球菌生物膜形成机制研究进展[J].生物技术通讯,2014,25(5):714.
- [2] 赵丽,陈杏春.住院患者脓液及伤口分泌物的病原菌分析[J].中国临床新医学,2013,6(8):779.
- [3] 刘晓蓉,葛云霞.白玉散治疗口腔溃疡患者的观察及护理[J].中国实用护理杂志,2011,27(36):1.
- [4] 刘晓蓉,王昆,葛云霞,等.复方白玉散外敷治疗慢性难愈性创面30例临床研究[J].江苏中医药,2016,48(9):44.
- [5] 张全凯,杨公明,余铭,等.实验用金黄色葡萄球菌生物被膜体外模型的建立[J].中国酿造,2014,33(5):53.
- [6] TREMBLAY Y D, LAMARCHE D, CHEVER P, et al. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms[J].J Dairy Sci, 2013, 96(1):234.
- [7] 晋兴,武爱荣,黄波,等.用纸片扩散法和微量稀释法进行药物敏感性测定的比较[J].国际检验医学杂志,2014,35(3):322.
- [8] 祝司霞.穿心莲内酯对金黄色葡萄球菌生物膜的体外抑制作用[J].广东医学,2016,37(11):1598.
- [9] 吴忠好.烧伤外科病人再手术原因分析与预防[J].中国医药导刊,2013,15(8):1459.
- [10] CLINTON A, CARTER T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies[J].Lab Med, 2015, 46(4):277.
- [11] 顾莎莎,葛云霞.白玉散用于体表脓肿切开引流换药的疗效观察[J].中国保健营养(中旬刊),2013(7):464.

第一作者:姚孝明(1973—),男,硕士,主任技师,临床检验诊断学专业。

通讯作者:刘晓蓉,本科学历,主任护师。476820302@qq.com

收稿日期:2017-05-21

编辑:吴宁