

## 鱼腥草素钠联合 EDTA-Na<sub>2</sub> 对生物被膜菌的影响

李 芳, 黄卫锋, 段强军, 吴大强, 程惠娟\*

安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038

**摘要:**目的 探索鱼腥草素钠(SH)联合乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)对生物被膜菌的影响,寻找潜在的抗生素替代品。方法 通过微量稀释法以及棋盘法,测定SH和EDTA-Na<sub>2</sub>对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、白色念珠菌(*Candida albicans*, CA)的最小抑菌浓度(MIC)和最小膜清除浓度(MBEC)以及两药协同点;通过平板稀释涂布法测定3种菌在协同点的生存曲线;扫描电子显微镜法(SEM)观察PA、SA和CA生物被膜的形态。结果 SH对PA、SA和CA的MIC分别为2.048、0.064、0.064 mg/mL, MBEC分别为2.048、0.256、0.512 mg/mL; EDTA-Na<sub>2</sub>对PA、SA和CA的MIC分别为3.75、0.938、0.117 mg/mL, MBEC分别为15、3.75、30 mg/mL; SH联合EDTA-Na<sub>2</sub>(SH/EDTA-Na<sub>2</sub>)对PA、SA和CA的MIC(mg/mL)分别为0.256/0.938、0.008/0.233、0.008/0.029, MBEC(mg/mL)分别为0.512/3.722、0.032/0.469、0.064/0.938; SEM观察到两药联合对细菌的生长抑制和生物被膜的清除有明显作用,载体上的细菌显著减少,未见或仅有少量的生物被膜结构,与空白对照组比较差异明显。结论 SH与EDTA-Na<sub>2</sub>具有协同作用,二者联合能够显著增强SH对PA、SA和CA的生长抑制和生物被膜的清除作用。

**关键词:** 鱼腥草素钠; 乙二胺四乙酸二钠; 生物被膜; 铜绿假单胞菌; 金黄色葡萄球菌; 白色念珠菌

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)24-3585-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.016

## Effect of sodium houttuifonate combined with EDTA-Na<sub>2</sub> against biofilm bacteria

LI Fang, HUANG Wei-feng, DUAN Qiang-jun, WU Da-qiang, CHENG Hui-juan

Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of sodium houttuifonate (SH) combined with EDTA-Na<sub>2</sub> (SH/EDTA-Na<sub>2</sub>) against biofilm bacteria, and to search for an alternative antibiotics. **Methods** The microdilution method and checkboard test were adopted to determine the minimal inhibitory concentration (MIC), minimal biofilm eradication concentration (MBEC), and synergistic points of SH and EDTA-Na<sub>2</sub> for *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Staphylococcus aureus* (SA), and *Candida albicans* (CA); Time-kill (T-K) curves of three kinds of bacteria in synergistic points were determined by dilution coating method; The morphology of PA, SA, and CA was observed by scanning electronic microscope (SEM). **Results** The MIC of PA, SA, and CA for SH was 2.048, 0.064, and 0.064 mg/mL, and MBEC was 2.048, 0.256, and 0.512 mg/mL, respectively; The MIC of PA, SA, and CA for EDTA-Na<sub>2</sub> was 3.75, 0.938, and 0.117 mg/mL, and MBEC was 15, 3.75, and 30 mg/mL, respectively; The MIC of PA, SA, and CA for SH/EDTA-Na<sub>2</sub> was 0.256/0.938, 0.008/0.233, and 0.008/0.029 mg/mL, and MBEC was 0.512/3.722, 0.032/0.469, and 0.064/0.938 mg/mL, respectively. Combination of the two drugs could significantly inhibit the growth and eradicate the biofilm of bacteria. The number of bacteria on carriers reduced notably under SEM, with no or little biofilm on carriers, compared with the blank control group. **Conclusion** EDTA-Na<sub>2</sub> could play a synergistic role in combination with SH against pathogens, and SH could inhibit the growth and eradicate biofilm of PA, SA, and CA more powerfully in combination with EDTA-Na<sub>2</sub>.

**Key words:** sodium houttuifonate; EDTA-Na<sub>2</sub>; biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Candida albicans*

细菌的耐药性已成为医学的一个棘手的问题,主免疫系统和抗生素的作用<sup>[1]</sup>。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)和白色念珠菌(*Candida albicans*, CA)是临床最常见的条件致病

收稿日期: 2014-04-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173629); 安徽中医药大学人才引进基金(2013RC003); 安徽中医药大学青年科学研究基金(2014qn007)

作者简介: 李 芳(1988—),女,硕士在读,主要从事中药新剂型研究。E-mail: lfahuang@163.com

\*通信作者 程惠娟,教授,硕士生导师。Tel: (0551)65169204 E-mail: chenghuijuan53@126.com

菌, 在医院感染中占有非常重要的地位, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是常见的化脓性病原菌, 这3种菌极易形成生物被膜并对传统抗生素都具有耐药性, 使感染难以控制<sup>[2-4]</sup>。因此, 寻找毒性较低、抗菌、抗生物被膜作用强的传统抗生素替代品引起了人们的兴趣。中药及其有效成分已经被证明是具有前途的抗菌药物<sup>[5-6]</sup>。此外, 据报道, 一些“非抗生素”类物质对细菌和真菌也有广谱的抑制作用, 如 EDTA<sup>[7-8]</sup>和乙醇<sup>[9]</sup>。但是这些药物往往抗菌作用较弱。中药的有效成分和“非抗生素”类有抗菌作用物质联合是否能增强抗菌、抗生物被膜作用是值得探讨的问题。本实验探索已经被证明在体外有抗生物被膜作用的鱼腥草素钠 (sodium houttuynonate, SH)<sup>[10-14]</sup>及有抗菌效果的乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na<sub>2</sub>) 联合用药对 PA、CA、SA 3种病原菌和生物被膜的作用。

## 1 材料

### 1.1 菌株

PA (ATCC27853)、SA (ATCC25923) 和 CA (SC5314), 均购于中国食品药品检定研究院。

### 1.2 药品、试剂和仪器

SH (质量分数 94.5%, 批号 100247-199601, 中国食品药品检定研究院); LB (Luria-Bertani) 培养基 (北京奥博星生物技术有限责任公司); RPMI 1640 (Gibco); EDTA-Na<sub>2</sub> (国药集团化学试剂有限公司); DPH-9162 型恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司); NRY-200 型台式恒温摇床 (上海南荣实验室设备有限公司); SpectraMax M2<sup>®</sup> 多功能酶标仪 [美谷分子仪器 (上海) 有限公司]; Sirion200 扫描电镜 (SEM, FEI 公司)。

## 2 方法

### 2.1 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

采用微量稀释法测定 SH、EDTA-Na<sub>2</sub> 对 PA、SA 和 CA 的 MIC。PA 和 SA 终浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL, CA 浓度为  $1 \times 10^3$  CFU/mL。SH 与 EDTA-Na<sub>2</sub> 设定的梯度分别为 2 048、1 024、512、256、128、64、32、16、8、4、2  $\mu$ g/mL 和 120、60、30、15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.235、0.117 mg/mL。在 96 孔板中每个梯度设 8 个复孔, 每孔分别加入 100  $\mu$ L 含 2 种药物的培养液和 100  $\mu$ L 菌液。混合后 PA、SA 和 CA 分别置于 37  $^{\circ}$ C 下静置培养 24、48 h, 测定 600 nm 吸光度 ( $A_{600}$ ) 值, 与空白对照组 (不含药物) 比较, 抑制率 80% 以上

的最低药物浓度为 MIC。实验重复 3 次。

### 2.2 最小膜清除浓度 (MBEC) 的测定

采用微量稀释法测定 SH、EDTA-Na<sub>2</sub> 对 PA、SA 和 CA 的 MBEC。3 种菌的终浓度均为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。药物梯度设置同“2.1”项。在 96 孔中每个梯度设 8 个复孔, 每孔分别加入 200  $\mu$ L 菌液后, 37  $^{\circ}$ C 恒温过夜培养 24 h, 去除培养基, 用无菌 PBS 洗涤 2~3 次去除浮游菌。再在每孔分别加入 100  $\mu$ L 含 2 种药物的培养液和 100  $\mu$ L 的无药培养基, 混合后 37  $^{\circ}$ C 恒温过夜培养 24 h, 测定  $A_{600}$ , 与空白对照组 (不含药物) 比较, 抑制率 80% 以上的最低药物浓度为 MBEC。实验重复 3 次。

### 2.3 SH 与 EDTA-Na<sub>2</sub> 协同点的测定

采用棋盘法分别向 96 孔板分别加入 SH 和 EDTA-Na<sub>2</sub>, 每种抗菌药物从 2 倍 MIC 浓度开始用无菌培养基倍比稀释 (SH 稀释 7 个浓度, EDTA-Na<sub>2</sub> 稀释 11 个浓度), 各取 50  $\mu$ L 分别排列在平板的行与列上, 然后在 96 孔板中加入 100  $\mu$ L 菌液, 37  $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h, 测定  $A_{600}$ , 与空白对照组 (不含药物) 比较, 抑制率 80% 以上的最低药物浓度为联合 MIC。通过计算部分抑制浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI)<sup>[15]</sup>判断相互作用:  $FICI < 0.5$  为协同作用,  $0.5 \leq FICI \leq 4.0$  为联合作用,  $FICI > 4.0$  为拮抗作用。

$$FICI = \frac{\text{联合 MIC}_{SH} / \text{单独 MIC}_{SH} + \text{联合 MIC}_{EDTA-Na_2} / \text{单独 MIC}_{EDTA-Na_2}}$$

### 2.4 协同点时细菌的生存曲线

选取合适的协同点, 采用平板稀释涂布法测定 PA、SA 和 CA 在 SH、EDTA-Na<sub>2</sub> 单独干预、SH 与 EDTA-Na<sub>2</sub> 共同干预 1、3、6、12、24 h 后的细菌数量。以不加药物的空白组作为对照。绘制细菌生存曲线。

### 2.5 扫描电子显微镜观察细菌形态

PA、SA 和 CA 分别接种于 LB 和 RPMI 1640 培养基中, 在 37  $^{\circ}$ C 下, 220 r/min 恒温摇床培养 24 h, 2 000 r/min 离心 10 min, 倾去上清液, 用 LB 和 RPMI 1640 培养基分别稀释, PA 和 SA 终浓度为  $7.5 \times 10^5$  CFU/mL, CA 浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。将 3 种菌液各 1 mL 分别接种于置入无菌玻片的 24 孔板中, 分别加入含有 SH、EDTA-Na<sub>2</sub> 和含有两药的培养基, 至药物终浓度为协同点的药物浓度, 37  $^{\circ}$ C 条件下, 培育 24 h, 镀银染色后, 扫描电镜观察细菌形态。

### 3 结果

#### 3.1 SH 和 EDTA-Na<sub>2</sub> 的 MIC 和 MBEC

采用微量稀释法测定 SH 和 EDTA-Na<sub>2</sub> 两种药物分别对 PA、SA 和 CA 的 MIC 和 MBEC, 结果见表 1。

#### 3.2 SH 与 EDTA-Na<sub>2</sub> 对浮游菌和生物被膜的协同点

由 SH 与 EDTA-Na<sub>2</sub> 两种药物干预 PA、SA 和 CA 的浮游菌和生物被膜 24 h 后的 A<sub>600</sub> 值得出 SH 与 EDTA-Na<sub>2</sub> 联合应用的 MIC, 进而得到 FICI, 以 SH 与 EDTA-Na<sub>2</sub> 对 PA、SA 和 CA 浮游菌和生物被膜具有协同作用的 MIC 或 MBEC 为协同点, 具体

表 1 SH 和 EDTA-Na<sub>2</sub> 对 PA、SA 和 CA 的 MIC 和 MBEC 值  
Table 1 MIC and MBEC of SH and EDTA-Na<sub>2</sub> for PA, SA, and CA

药物	MIC/(mg·mL <sup>-1</sup> )			MBEC/(mg·mL <sup>-1</sup> )		
	PA	SA	CA	PA	SA	CA
SH	>2.048	0.064	0.064	>2.048	0.256	0.512
EDTA-Na <sub>2</sub>	3.75	0.938	0.117	15	3.75	30

协同点对应的药物 (SH/EDTA-Na<sub>2</sub>) 质量浓度 (mg/mL) 分别为 0.256/0.938 和 0.512/3.722、0.008/0.233 和 0.032/0.469、0.008/0.029 和 0.064/0.938。具体结果见表 2。

表 2 SH 与 EDTA-Na<sub>2</sub> 联合抗 PA、SA 和 CA 的协同点

Table 2 Synergistic point of SH in combination with EDTA-Na<sub>2</sub> against PA, SA, and CA

菌株	浮游菌		生物被膜	
	MIC <sub>SH</sub> /MIC <sub>EDTA-Na<sub>2</sub></sub> / (mg·mL <sup>-1</sup> )	FICI <sub>MIC</sub>	MBEC <sub>SH</sub> /MBEC <sub>EDTA-Na<sub>2</sub></sub> / (mg·mL <sup>-1</sup> )	FICI <sub>MBEC</sub>
PA	0.256/0.938	<0.5	0.512/3.722	<0.5
SA	0.008/0.233	0.375	0.032/0.469	0.250
CA	0.008/0.029	0.375	0.064/0.938	0.156

#### 3.3 生存曲线

分别以协同点对应的药物 (SH/EDTA-Na<sub>2</sub>) 质量浓度干预 PA、SA 和 CA 的浮游菌和生物被膜菌不同时间, 得到 3 种菌在药物协同点质量浓度时的生存曲线。见图 1。

#### 3.4 形态学观察

扫描电子显微镜观察 PA、SA 和 CA 浮游菌和生物被膜在协同点药物质量浓度作用 24 h 后的形态, 镜下观察到浮游菌的空白对照组载体上由密集

的胞外基质形成黏液层, 大部分细菌已被包裹在有胞外基质形成的黏液层下, 少量细菌镶嵌在黏液层之间, 形成了早期的生物被膜; SH 和 EDTA-Na<sub>2</sub> 抑制了浮游菌的生物被膜形成, 镜下均未观察到明显的生物被膜结构; 两药联合作用的载体上仅存在散在的黏液且细菌数量少, 形态清晰, 没有生物被膜形成 (图 2)。图 2 显示生物被膜的空白对照组载体上的生物被膜层明显增厚如蘑菇状形态, 其内部有相互交织的孔道, 细菌被胞外基质完全覆盖; 而

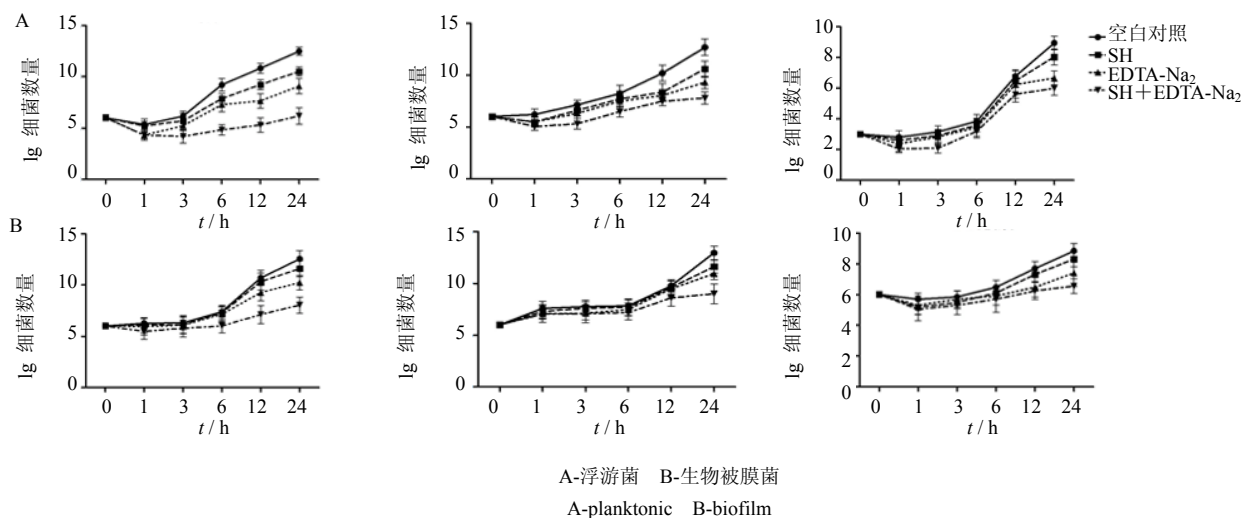


图 1 PA、SA 和 CA 在 SH 和 EDTA-Na<sub>2</sub> 协同点质量浓度下的生存曲线  
Fig. 1 T-K curves of PA, SA, and CA in synergistic points

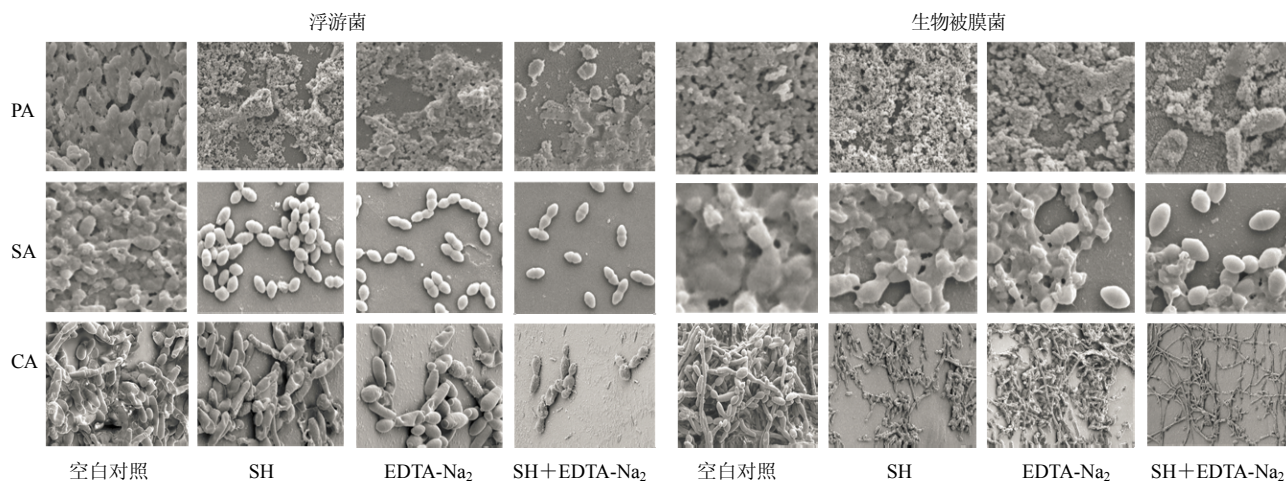


图 2 扫描电镜下 PA、SA 和 CA 菌的形态

Fig. 2 Morphological observation of PA, SA, and CA by SEM

SH 和 EDTA- $\text{Na}_2$  组的生物被膜结构被局部破坏; SH 与 EDTA- $\text{Na}_2$  联合作用的载体上的生物被膜结构被破坏, 仅存在散在的黏液或较少的交织物, 出现散落的细菌。同一质量浓度下, 联合用药组对细菌生长的抑制作用和对生物被膜的清除作用较单药组显著。

#### 4 讨论

鱼腥草是我国传统中药, 具有清热解毒、抗菌、抗病毒、利尿消肿等作用, 并是治疗痰热壅肺、发为肺痈、咳吐脓血的要药, 是国家卫生部正式确定为药食两用的品种之一。SH 是鱼腥草 (三白草科) 中由挥发油组成的鱼腥草素和亚硫酸氢钠共同合成的化合物<sup>[16]</sup>。在国内 SH 作为抗菌药用于临床多年, 取得了很好的疗效。然而, 研究 SH 或者联合其他药物抗菌或生物被膜方面仍然很少。最近有文献报道<sup>[10,17]</sup>, SH 及其衍生物在体外单独或与其他抗生素联用能够有效抑制 PA 和 SA 的生长繁殖。EDTA- $\text{Na}_2$  是常用的螯合试剂, 作为联合药物或抑制细菌、真菌等病原体蛋白的合成的试剂已经被广泛应用, 这可能与抑制菌丝的生成从而破坏生物被膜的形成有关<sup>[18]</sup>。本实验用 SH 联合 EDTA- $\text{Na}_2$  抗生物被膜菌 PA、SA 和 CA, 证明了 SH 与 EDTA- $\text{Na}_2$  联用不仅对 PA 具有协同作用, 而且对 SA 和 CA 也有协同作用, 尤其对它们的生物被膜。由于细胞数量增加, SH 和 EDTA- $\text{Na}_2$  对 CA 生物被膜 (约为  $10^6$  CFU/mL) 的 MBEC 值显著高于浮游细胞 (约为  $10^3$  CFU/mL), 因此, 相比于对 SA 和 PA 生物被膜的抑制作用, EDTA- $\text{Na}_2$  更难以完全消除

CA 的生物被膜。SH 与 EDTA- $\text{Na}_2$  联用时能够大大降低药物的用量, 并能杀死浮游菌和清除生物被膜。

一般传统抗生素在抗菌方面往往优于中药或其有效成分, 但目前常规应用的抗生素只能杀灭浮游菌, 对膜内菌的清除没有很好的疗效, 致使膜内菌长期存活, 释放时又会引起新的感染, 从而使感染反复发作, 长期应用会导致耐药菌株的增多。鱼腥草是药食两用的天然植物, 具有长期服用对人体无毒副作用<sup>[19]</sup>, 不形成耐药两大优势。总之, 本研究结果显示: (1) SH 对 PA、SA 和 CA 都有抑制作用, 尤其对 SA 和 CA 更加有效; (2) SH 与 EDTA- $\text{Na}_2$  联合对 PA、SA 和 CA 都具有协同作用, 并对这 3 种菌的生长和生物被膜有强有力的抑制和清除作用, 表明 SH 可能是潜在的抗生素替代品, 特别是结合 EDTA- $\text{Na}_2$ , 使其在抗感染治疗中有良好的应用前景。

#### 参考文献

- [1] Clatworthy A E, Pierson E, Hung D T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(9): 541-548.
- [2] Mulet X, Macia M D, Mena A, et al. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of nfxB mutants [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(4): 1552-1560.
- [3] Singh R, Ray P, Das A, et al. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(9): 1955-1958.
- [4] Uppuluri P, Srinivasan A, Ramasubramanian A A, et al. Effects of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin

- on *Candida albicans* biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(7): 3591-3593.
- [5] Zeng X P, Liu X Y, Bian J, *et al.* Synergistic effect of 14- $\alpha$ -lipoyl andrographolide and various antibiotics on the formation of biofilms and production of exopolysaccharide and pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(6): 3015-3017.
- [6] Zhang H, Wang K, Zhang G, *et al.* Synergistic anti-candidal activity of tetrandrine on ketoconazole: an experimental study [J]. *Planta Med*, 2010, 76(1): 53-61.
- [7] Al-Bakri A G, Othman G, Bustanji Y. The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(1): 280-286.
- [8] El-Sharif A A, Hussain M H. Chitosan-EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections [J]. *Curr Microbiol*, 2011, 62(3): 739-745.
- [9] Peters B M, Ward R M, Rane H S, *et al.* Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(1): 74-82.
- [10] Shao J, Cheng H J, Wang C Z, *et al.* A phytoanticipin derivative, sodium houttuynfonate, induces *in vitro* synergistic effects with levofloxacin against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 11242-11254.
- [11] 朱玲玲, 孙振新, 程惠娟, 等. 鱼腥草素钠对头孢他啶抗铜绿假单胞菌生物被膜的增强作用及抗菌协同作用 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(10): 2353-2355.
- [12] 程惠娟, 张昌峰, 汪长中, 等. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜藻酸盐合成的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 455-460.
- [13] 程惠娟, 汪长中, 卢文波, 等. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌黏附的清除作用及对生物被膜形成的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3297-3301.
- [14] 程惠娟, 汪长中, 胡跃龙, 等. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜的清除作用 [J]. 中成药, 2012, 34(12): 2274-2277.
- [15] Odds F. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52(1): 1.
- [16] 张美玉, 李连达. 鱼腥草及其制剂研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(2): 79-85.
- [17] Lu X, Yang X, Li X, *et al.* *In vitro* activity of sodium new houttuynfonate alone and in combination with oxacillin or netilmicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68053.
- [18] Ramage G, Wickes B L, Lopez-Ribot J L. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA) [J]. *Mycopathologia*, 2007, 164(6): 301-306.
- [19] Wang D Y, Yu Q H, Eikstadt P, *et al.* Studies on adjuvanticity of sodium houttuynfonate and its mechanism [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(10): 1411-1418.