

中药对细菌生物被膜作用机制的研究进展

王旭东¹, 胡海波², 王振山³, 黄浩², 赵振营^{4*}

1. 天津市蓟州区下窝头镇卫生院, 天津 301900

2. 赣南医学院, 江西 赣州 341000

3. 中国人民解放军联勤保障部队第九八三医院, 天津 300142

4. 天津市人民医院, 天津 300121

摘要: 如今越来越多耐药细菌的出现, 对于细菌耐药的研究显得更为迫切, 而现今的研究已经发现细菌的生物被膜是其耐药作用的一个独特机制。许多中药被发现对于细菌的生物被膜具有抑制作用, 是细菌耐药性研究中一个独特的研究领域。通过查阅分析国内外有关中药对细菌生物被膜抗菌作用的文献, 从细菌生物被膜形成过程、细菌生物被膜的耐药机制以及中药对于细菌生物被膜的作用等方面进行综述, 为进一步研究中药的抗菌作用提供参考。

关键词: 中药; 生物被膜; 抗菌; 群体感应

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)07-2248-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.07.068

Research progress on mechanism of traditional Chinese medicine on bacterial biofilm

WANG Xu-dong¹, HU Hai-bo², WANG Zhen-shan³, HUANG Hao², ZHAO Zhen-ying⁴

1. Xiawatou Hospital, Jizhou District, Tianjin 301900, China

2. Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China

3. 983 Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Tianjin 300142, China

4. Tianjin Union Medical Center, Tianjin 300121, China

Abstract: With the emergence of more and more drug-resistant bacteria, the research on bacterial resistance is much more urgent, and many researchers have found that the biofilm of bacteria is a unique mechanism of its drug resistance. Many traditional Chinese medicine have been found to inhibit the biofilm of bacteria and provoked unique research field in bacterial resistance. By consulting and analyzing the local and international researches on the antibacterial effect of traditional Chinese medicine on bacterial biofilms, from aspects of bacterial biofilm formation process, biofilm resistance mechanism as well as how traditional Chinese medicine affecting biofilms, to provide references for further researches on antibacterial action of traditional Chinese medicine.

Key words: traditional Chinese medicine; biofilm; antibacterial; quorum sensing

细菌生物被膜的发现和研究是一个漫长的过程, 光学显微镜不足以观察到生物被膜的具体细节, 直至电子显微镜的发明才能详细观察到生物被膜是各种微生物的一种聚集形态。生物被膜通常出现在体内或体表留置医疗装置上或内部, 如隐形眼镜、中心静脉导管、机械心脏瓣膜、腹膜透析导管、假体关节、起搏器、导尿管等, 细菌生物被膜的形成

增强细菌对抗生素的抵抗能力和耐药性, 造成抗菌药物治疗效果下降、医疗成本的增加。中药使用历史悠久、来源和功效明确, 在抗菌药物筛选和研究中有得天独厚的资源优势, 因此从影响生物被膜角度研究中药抗菌作用机制具有重要意义。细菌生物被膜的耐药机制包括生物被膜的屏障作用、微环境作用、抗生素外排泵效应、细菌的群体感应效应等

收稿日期: 2019-01-23

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81660595、81660639); 江西省教育厅科技青年项目 (GJJ150941)

作者简介: 王旭东, 主治医师, 学士, 从事基层全科研究。E-mail: 1456698373@qq.com

*通信作者 赵振营, 副主任药师, 博士, 从事临床药学研究。Email: clinpharmzhao@163.com

多方因素,而中药在阻断这些生物被膜作用方面有着独特的效用。不少临床研究发现中药联合抗生素的治疗方案对于耐药菌感染的治疗效果有明显的改善,除了中药直接作用于耐药菌提高其对抗生素的敏感性外,还在于一些中药对于细菌生物被膜有特定的作用,从而减弱了细菌对于抗生素的抵抗作用。本文主要综述了中药对细菌生物被膜作用机制的研究进展。

1 降低细菌生物被膜的屏障作用

生物被膜的渗透屏障作用是阻止抗菌药物和抗生素靠近细菌并发挥作用的一道天然屏障。生物被膜的胞外多糖屏障中存在的共价键、氢键、范德华力能够吸附一部分抗菌药物,有效的降低一些抗生素多肽分子以及一些大分子蛋白质靠近菌体,这就使得抗菌药物的有效性降低。

1.1 痰热清注射液

痰热清注射液是一种用于治疗生物膜相关上呼吸道感染的中药。治疗生物膜相关传染病的困难在于大多数商业抗生素不能穿透生物膜屏障以杀死活细胞。体外数据显示痰热清注射液在消灭浮游细菌方面不如青霉素有效。然而,痰热清注射液的抗生物膜活性不同于青霉素,痰热清注射液不仅可以抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成,还可以杀死嵌入金黄色葡萄球菌生物膜基质中的活细胞。痰热清注射液的活性成分在与生物膜中的活细胞相互作用之前可以穿透生物膜基质,而青霉素则不能。研究通过 XTT 染色验证了痰热清注射液的抗生物膜活性。形态学数据也表明痰热清注射液不能破坏或破坏成熟的生物膜。这意味着痰热清注射液的活性成分必须穿透生物膜基质才能与生物膜中的活细胞相互作用。此外,必须指出的是,痰热清注射液杀灭生物膜细菌中的浓度远远低于杀死浮游细胞的浓度(58 g/mL vs 1 650 g/mL)。这表明生物膜中的活细胞与浮游生物相比应该具有不同的特性。一旦活性成分能够穿透生物膜基质,生物膜中的活细胞就更容易被杀灭^[1]。

1.2 桑螵蛸脂质提取物

来自桑螵蛸的脂质提取物由超过 16 种化合物组成,并且油酸、9,12-十八碳二烯酸和 9,12,15-十八碳三烯酸共同占提取物的比例多至 79.74%^[2]。研究结果显示与环丙沙星相比,桑螵蛸脂质提取物对预先形成的生物膜的根除效果更明显。测定结果清楚地表明,与未处理的细菌相比,桑螵蛸脂质提取物对附着的细菌细胞的细胞膜造成严重损害,并且

还对生物被膜显示出明显的影响,降低了细菌生物被膜的屏障作用。

1.3 大黄提取物

张忠斌等^[3]研究采用扫描电镜法测定不同浓度大黄提取物对猪链球菌生物被膜的消除影响,发现生物被膜的消除具有剂量相关性,当大黄提取物浓度大于 7.8 mg/mL 时对猪链球菌生物被膜具有良好的消除作用。同时也对药物的作用时间进行了考察,发现大黄提取物对猪链球菌生物被膜的消除具有时间相关性,当作用时间大于 12 h 时,大黄提取物对猪链球菌生物被膜具有良好的消除效果,生物被膜消除从而减弱了猪链球菌的耐药性。

2 抑制细菌的群体感应

细菌可通过分泌化学信号分子来检测菌群密度以及调控细菌的多种生理功能,从而适应周围环境的变化,这种信息交流系统被称为细菌群体感应(QS)系统。这种信息交流机制最早于 1970 年在对一种海洋微生物费氏弧菌的发光机制进行研究时被发现^[4]。细菌分泌的群体感应信号分子可以感受到周围细菌的数量变化,然后激活特定的基因表达,从而调控生物被膜的形成,如 *N*-乙酰高丝氨酸内酯 AHLs 介导的革兰阴性细菌群体感应 QS 系统、寡肽介导的革兰阳性菌 QS 系统等。

2.1 群体感应抑制剂

荧光假单胞菌是革兰阴性嗜冷菌,是引起冷冻原料乳和水产品腐败的主要微生物。QS 广泛存在于细菌中以监测其种群密度并引导相应靶基因表达,调节许多生理活动,如铁载体的分泌、菌群运动和生物被膜形成。因此,群体感应抑制剂可能是控制由荧光假单胞菌引起的食物变质的另一种有希望的新方法。鱼腥草素、甲酸红甲酯等能对荧光假单胞菌 P07 表型的游动和群集运动、胞外酶和铁蛋白的产生、*N*-酰基高丝氨酸内酯含量的调节和生物膜的形成等方面产生抑制作用^[5]。

2.2 黄芩苷

QS 在控制毒力因子和铜绿假单胞菌中生物膜形成的基因的精确调节中起作用。研究证明黄芩苷的亚最小抑菌浓度(MIC)能够抑制铜绿假单胞菌生物被膜的形成,增强各种常规抗生素的杀菌作用。此外,黄芩苷对铜绿假单胞菌 QS 调节的毒力表型(LasA 蛋白酶、LasB 弹性蛋白酶、绿脓菌素、鼠李糖脂和外毒素 A)等具有剂量相关性的抑制作用。在亚 MIC、MIC 黄芩苷处理后, QS 调节基因(包

括 *lasI*、*lasR*、*rhlI*、*rhlR*、*pqsR* 和 *pqsA*) 的表达水平受到抑制, 导致 QS 信号分子 3-oxoC12-HSL 和 C4-HSL 的显著降低^[6]。证实黄芩苷介导的群体感应抑制能够改变基因和蛋白质表达, 黄芩苷可能是一种有效的 QS 抑制剂和抗生物膜剂, 用于对抗铜绿假单胞菌生物膜相关感染。

2.3 穿心莲内酯

穿心莲内酯可干扰生物被膜的产生和成熟, 降低厚度, 增强喹诺酮类药物左氧氟沙星的渗透性抑制铜绿假单胞菌群体感应系统中 *lasR*、*rslR* 基因和 *pvdQ* 基因 mRNA 的表达, 可能是其干预生物被膜形成的作用机制; 穿心莲内酯提高体外铜绿假单胞菌对左氧氟沙星的敏感性及增强巨噬细胞吞噬能力, 提示穿心莲内酯可以发挥抗菌药物增效作用^[7]。

2.4 白头翁

毛茛科植物白头翁中一种天然活性成分白头翁素, 具有抗菌作用, 能抑制铜绿假单胞菌标准株 PA01 的群体感应系统调控的毒力因子蛋白水解酶、绿脓菌素和弹性蛋白酶的表达, 从而抑制铜绿假单胞菌群体感应系统, 降低了铜绿假单胞菌的耐药性^[8]。

3 对细菌生物被膜中细菌表型变化的抑制

生活在生物被膜中的细菌经过一定时间的适应后, 其菌体会表现出一定的遗传学改变, 这些改变可以促使这些细菌的表型发生相应改变, 使得生物被膜中的细菌倾向于抵抗抗菌药物的方向进化。

3.1 败酱草提取物

铜绿假单胞菌是一种重要的人类病原体, 可导致严重且难以治疗的人类感染。败酱草提取物对几乎所有这些生物被膜相关基因均显示出显著的抑制作用。定量分析表明败酱草提取物能够显著减少未成熟生物膜的形成并明显改变铜绿假单胞菌成熟生物膜的结构, 它还降低了胞外多糖的产生并促进了菌群的运动、高代谢和生物被膜屏障的减弱都促使了抗菌药物在菌群中产生作用^[9]。

3.2 血根碱

血根碱的 50%抑制浓度 (IC_{50}) 为 3.2 $\mu\text{g/mL}$, 而 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 血根碱可抑制白色念珠菌生物被膜。进一步研究表明, 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 血根碱可降低细胞表面疏水性 (CSH) 并抑制菌丝形成。根据相关 RT-PCR 结果表明, 白色念珠菌暴露于血根碱抑制了与环 cAMP 途径相关的一些黏附和菌丝特异性必需基因的表达, 包括 *ALS3*、*HWP1*、*ECE1*、*HGC1* 和 *CYR1*^[10]。同时, 血根碱使白色念珠菌的内源性 cAMP 水平下

调, 并且添加 cAMP 后挽救了血根碱诱导的丝状缺陷, 证实了与 cAMP 途径相关。此外, 血根碱对人脐静脉内皮细胞的毒性相对较低, IC_{50} 为 7.8 g/mL 。总的来说, 血根碱对白色念珠菌生物被膜具有很强的活性, 并且该活性与其对 cAMP 途径抑制引起的黏附和菌丝形成的抑制作用有关。

3.3 白花蛇舌草提取物

研究显示白花蛇舌草提取物能显著且剂量相关性地抑制流感嗜血杆菌生物膜的形成。在添加提取物后不久, 流感嗜血杆菌的生物膜相关基因 *luxS* 的 mRNA 水平显著降低, 并且抑制效果持续至少 2 h^[11]。在添加白花蛇舌草提取物后 2 h, 白花蛇舌草提取物中的自诱导剂也以剂量相关性方式显著降低。这些结果均表明, 白花蛇舌草提取物显示出对 *luxS* 相关性生物膜形成的抑制活性, 但对流感嗜血杆菌的浮游细胞没有抗菌活性。因此, 白花蛇舌草提取物可用作治疗由流感嗜血杆菌引起的呼吸道感染的辅助疗法。

4 抑制细菌生物膜的形成

在细菌生物被膜形成后, 生物被膜的机械屏障、电荷屏障等的协同作用使得抗菌药物渗透更难进行, 延缓了药物作用的发挥。因此在生物被膜形成时对其产生一定抑制作用的药物对于耐药菌株引起的感染具有一定的作用。

4.1 黄连水提取物

研究发现黄连水提取物 (25、50 $\mu\text{g/mL}$) 足以抑制生物被膜形成, 在抗黏附测定中显著抑制猪链球菌黏附。一些基因如 *gapdh*、*sly* 和 *mrp*, 以及参与黏附的蛋白质, 如抗原样蛋白、CPS16V 和甲基转移酶 H, 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 黄连水提取物处理的细胞中被显著调节^[12]。研究结果表明黄连水提取物在抑制猪链球菌细胞的黏附以及因此生物被膜形成中起重要作用。

4.2 银杏酚酸

研究从银杏叶中提取的银杏酚酸对变形链球菌的生长、产酸、黏附、生物被膜形成和生物被膜形态的影响。结果表明银杏酚酸不仅能抑制变形链球菌浮游细胞的生长, MIC 为 4 $\mu\text{g/mL}$, 最小杀菌浓度 (MBC) 为 8 $\mu\text{g/mL}$, 而且还能抑制酸的产生和对唾液的黏附。此外, 银杏酚酸可有效抑制变形链球菌生物被膜的形成, 并且在低浓度 (32 $\mu\text{g/mL}$) 下将变形链球菌 1 d 生物被膜的生成减少 50%或更多^[13]。此外, 研究表明银杏酚酸有效地破坏了生物

被膜结构的完整性。银杏酚酸是一种天然的抗龋剂,因为它对变形链球菌具有抗菌活性,并抑制与其致龋性相关的特定毒力因子。

4.3 鱼腥草酸钠

铜绿假单胞菌可以通过隐藏在自我构建的生物被膜中实现自我保护。研究发现鱼腥草酸钠可有效抑制铜绿假单胞菌的生物被膜的形成和菌群运动。鱼腥草酸钠能够以剂量相关的方式有效抑制铜绿假单胞菌的生物被膜分散,以及关键生物膜调节剂 BdlA 的基因和相关蛋白的表达^[14]。此外,鱼腥草酸钠可以渗透到铜绿假单胞菌的生物被膜中,从而抑制生物被膜的生命周期,从两方面有效的增强了抗菌药物对铜绿假单胞菌的药效。另一项研究表明:(1)左氧氟沙星和鱼腥草酸钠对铜绿假单胞菌具有明显的协同作用,MIC 值分别为 0.25、128 $\mu\text{g/mL}$;(2)二分之一最低抑菌浓度鱼腥草酸钠与二倍最低抑菌浓度左氧氟沙星结合可有效抑制铜绿假单胞菌的生物被膜的形成,抑制率高达 73%^[15];(3)在左氧氟沙星和鱼腥草酸钠的组合处理后,观察到更多的细胞外聚合物结构(EPS)的去除以及更多的死亡细菌,证明了这种抗菌剂在未来生物膜相关感染方向上有一定的希望。

4.4 黄芩素

黄芩素不能抑制铜绿假单胞菌的生长,然而在 20 $\mu\text{mol/L}$ 的较低浓度下显著抑制细菌的生物被膜形成,4~40 mmol/L 促进大肠杆菌中信号受体 TraR 蛋白水解^[16]。黄芩素和氨基青霉素联合使用显示出对铜绿假单胞菌的协同活性。此外,黄芩素还可以干扰铜绿假单胞菌的群体感应系统,有望被开发为具有新靶点的抗菌剂。

4.5 甘草查耳酮 A

甘草对金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用,在甘草查耳酮 A 作用诱导下,金黄色葡萄球菌中自溶素及相关转录调节基因、生物被膜形成基因、菌蛋白合成基因、荚膜多糖编码基因等表达均受到甘草查耳酮 A 的影响,从而抑制生物被膜的形成^[17]。

4.6 败酱草提取物

败酱草提取物对生物被膜抑制作用的研究表明 48 h 加入败酱草提取物浓度越大,抑制效果越显著。在聚集试验中不添加败酱草提取物组的聚合度为 89.91%,而含有 8 mg/mL 败酱草提取物组的聚合度仅为 68.60%^[18]。通过细胞表面黏附试验、聚集试验以及细菌运动性测试表明败酱草提取液通过影响细

胞聚合、表面黏附及细菌运动性,抑制了金黄色葡萄球菌生物被膜的形成及生长。

4.7 连翘苷

王业梅等^[19]研究表明 1 000 mg/L 连翘苷在 2、4、6 h 对铜绿假单胞菌的黏附均有明显抑制作用,100 mg/L 连翘苷在 2、4 h 也显示抑制作用,提示连翘苷可以部分干预该菌生物被膜早期的发育。与对照组相比,100 mg/L 与 1 000 mg/L 连翘苷均可明显干预铜绿假单胞菌生物被膜的发育,并且随着药物浓度的增加,对该菌生物被膜发育的抑制作用有增强趋势。

4.8 五倍子醇提液

带有白假丝酵母生物被膜表面污染的植入性医疗器械,可将此种病原迁移性地种植于深在组织和心血管系统中,使其成为了医院内感染的主要病原体。五倍子为漆树科植物盐肤木、青麸杨或红麸杨叶上的虫瘿,主要由五倍子蚜虫寄生而形成,通过体外试验观察五倍子醇提液对铜绿假单胞菌生物膜的影响,结果显示五倍子醇提液对铜绿假单胞菌生物膜有完全清除效应,对血链球菌、变形链球菌、黏性放线菌等形成的细菌生物膜有很强的抑制作用,其是多倍酰葡萄糖的混合物,主要有效成分为鞣质^[20]。

5 结语

如今越来越多细菌的耐药性带来了抗菌用药的治疗困难,生物膜对抗生素的耐药性已达到惊人的状态。一旦生物膜成熟,抗生素的治疗将会无效。而生物被膜的影响主要见于医学“植入装置”,留置医疗装置上的生物被膜形成极大地影响器械手术以及公共健康。如今研究的多种中药能通过抑制细菌生物被膜的形成,抑制细菌的群体感应,降低生物被膜的屏障作用以及抑制细菌在生物被膜中的表型变化来弱化细菌生物被膜对于抗生素的抵抗作用,为今后研究细菌耐药性提供了一个可靠的思路,抗生素与中药的联合应用也许能在抗菌的领域上取得更好的效果。

参考文献

- [1] Wang Y, Wang T, Hu J, *et al.* Anti-biofilm activity of TanReQing, a Traditional Chinese Medicine used for the treatment of acute pneumonia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(1): 165-170.
- [2] Wang W D, Zhang N N, Chanda W, *et al.* Antibacterial and anti-biofilm activity of the lipid extract from *Mantidis*

- ootherca on *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19(5): 364-371.
- [3] 张忠斌, 高天, 丁文雅, 等. 大黄提取物对猪链球菌生物被膜的消除作用 [J]. *黑龙江医药*, 2016, 29(6): 1056-1058.
- [4] 郭冰怡, 董燕红. 细菌群体感应抑制剂研究进展 [J]. *农药学报*, 2018, 20(4): 408-424.
- [5] Ding T, Li T, Li J. Identification of natural product compounds as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas fluorescens* P07 through virtual screening [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(14): 4088-4099.
- [6] Luo J, Dong B, Wang K, et al. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176883.
- [7] 陈思敏. 穿心莲内酯干预铜绿假单胞菌形成及系统相关基因表达的实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [8] 吕子敏, 邓丽, 廖芳, 等. 原白头翁素对铜绿假单胞菌群体感应系统调控的毒力因子表达量的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(2): 155-159.
- [9] Fu B, Wu Q, Dang M, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by traditional Chinese medicinal herb *Herba Patriniae* [J]. *Biomed Res Int*, 2017: 9584703.
- [10] Zhong H, Hu D D, Hu G H, et al. Activity of sanguinarine against *Candida albicans* biofilms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(5): e02259-16.
- [11] Wajima T, Anzai Y, Yamada T, et al. Oldenlandia diffusa extract inhibits biofilm formation by haemophilus influenzae clinical isolates [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0167335.
- [12] Li Y H, Zhou Y H, Ren Y Z, et al. Inhibition of *Streptococcus suis* adhesion and biofilm formation *in vitro* by water extracts of *Rhizoma Coptidis* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 371.
- [13] He J, Wang S, Wu T, et al. Effects of ginkgoneolic acid on the growth, acidogenicity, adherence, and biofilm of *Streptococcus mutans* *in vitro* [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2013, 58(2): 147-153.
- [14] Wang T, Huang W, Duan Q, et al. Sodium houttuyfonate *in vitro* inhibits biofilm dispersion and expression of bdlA in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Mol Biol Rep*, 2018, 46(1): 471-477.
- [15] Shao J, Cheng H, Wang C, et al. A phytoantiseptic derivative, sodium houttuyfonate, induces *in vitro* synergistic effects with levofloxacin against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 1242-1254.
- [16] Zeng Z, Qian L, Cao L, et al. Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(1): 119-126.
- [17] 申凤鸽. 甘草查耳酮 A 抗金黄色葡萄球菌生物被膜的分子机制初步研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [18] 卢佳琨. 败酱草中黄酮类化合物的提取及其抗氧化活性 [D]. 锦州: 渤海大学, 2013.
- [19] 王业梅, 程惠娟. 连翘苷对铜绿假单胞菌黏附功能及生物被膜形成能力的影响 [J]. *中成药*, 2013, 35(4): 832-834.
- [20] 向丽, 李蓉, 周铁军, 等. 五倍子鞣质对生物被膜型白假丝酵母的干预作用 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(27): 13262-13264, 13269.