

苦参总碱抗表皮葡萄球菌的作用机制研究

王李俊, 杨 琴, 叶 敏, 刘志强

江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000

摘 要: **目的** 考察苦参总碱对表皮葡萄球菌体外培养生物膜的抑制作用, 观察苦参总碱是否会影响表皮葡萄球菌对乳酸和过氧化氢的耐受性, 并探索其可能的作用机制。 **方法** 体外培养表皮葡萄球菌产膜菌株, 使用半定量黏附实验、结晶紫染色法及刚果红实验评估苦参总碱对表皮葡萄球菌生物膜的抑制作用。采用扫描电镜观测表皮金黄色葡萄球菌生物膜形成。苦参总碱处理后, 检测表皮葡萄球菌对氧化胁迫的耐受力的变化, 利用实时荧光定量 PCR 法检测氧化应激响应基因 *serp2195* 和 *gpxA-2* 表达水平变化。 **结果** 结晶紫染色法显示 5.0 mg/mL 的苦参总碱对表皮葡萄球菌生物膜的形成具有显著的抑制作用 ($P < 0.001$), 且与刚果红实验结果保持一致。苦参总碱作用后表皮葡萄球菌对氧化胁迫耐受性明显减弱, 对乳酸的敏感性增强; 实时荧光定量 PCR 显示氧化应激响应基因 *serp2195* 和 *gpxA-2* 转录水平明显下降。 **结论** 苦参总碱对表皮葡萄球菌生物膜形成具有显著抑制作用, 减弱细菌对氧化胁迫耐受性, 其作用机制可能与下调表皮葡萄球菌氧化应激响应基因 *serp2195* 和 *gpxA-2* 表达相关; 同时苦参总碱可以减弱表皮葡萄球菌对乳酸耐受性。

关键词: 苦参总碱; 表皮葡萄球菌; 生物膜; 氧化胁迫; 乳酸耐受性; 阴道微生态

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)24-6032-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.017

Study on mechanism of total alkaloids of *Sophora flavescens* against *Staphylococcus epidermidis*

WANG Li-jun, YANG Qin, YE Min, LIU Zhi-qiang

Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China

Abstract: **Objective** To detect the effect of alkaloids of *Sophora flavescens* on biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* *in vitro*, and to observe whether total alkaloids of *S. flavescens* can affect the tolerance of *Staphylococcus epidermidis* to lactic acid and hydrogen peroxide, then explore the possible anti-microbial mechanism of alkaloids in *Sophora flavescens*. **Methods** The biofilm of *Staphylococcus epidermidis* was prepared *in vitro*. We evaluated the effect of alkaloids in *S. flavescens* on the biofilm-forming ability of *Staphylococcus epidermidis* via 96-well cell culture microtiter plates with crystal violet staining as well as Congo red experiment. The biofilm formation of *Staphylococcus aureus* was observed using scanning electron microscope. Then, we measured the change of tolerance to oxidative stress and sensibility to antibiotics for *Staphylococcus epidermidis* being treated by alkaloids in *S. flavescens* Ait. qRT-PCR analysis was performed to show the relative transcript level of *serp2195* and *gpxA-2* upon *Staphylococcus epidermidis* strain exposed to alkaloids in *S. flavescens* at different concentrations. **Results** Alkaloids in *S. flavescens* significantly prevented biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* ($P < 0.001$) at the concentration of 5.0 mg/mL during crystal violet staining and Congo red experiment, and thus weakened tolerance to oxidative stress and enhanced sensibility to lactate for *Staphylococcus epidermidis*. Alkaloids in *S. flavescens* could downregulate the transcript level of *serp2195* and *gpxA-2*. **Conclusion** Alkaloids in *S. flavescens* has a significant inhibitory effect on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*, which weakens the tolerance of bacteria to oxidative stress. The mechanism may be realized by downregulating the transcript level of *serp2195* and *gpxA-2*, and alkaloids in *S. flavescens* could reduce *Staphylococcus epidermidis* tolerance to lactic acid. To sum up, Alkaloids in *S. flavescens* can be applied to the gynecological infection caused by biofilm-producing bacteria.

Key words: total alkaloids of *Sophora flavescens*; *Staphylococcus epidermidis*; biofilm; oxidative stress; lactic acid-tolerance; vaginal microecosystem

收稿日期: 2019-07-16

作者简介: 王李俊 (1981—), 男, 江西东乡人, 硕士, 副教授, 主管中药师, 主要从事药用植物分子生物学研究。

Tel: (0794)8228608 E-mail: www736@163.com

表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* 是阴道微生态中一种常见的条件致病菌, 随着对表皮葡萄球菌研究的深入, 发现其可作为耐药基因的贮藏场所, 能够形成生物被膜及其他毒力因子^[1], 此外, 还可以分泌大量的细胞外多糖黏质物质从而致使机体的免疫应答能力降低, 免疫吞噬作用受到抑制^[2]。大量的研究表明, 表皮葡萄球菌与需氧菌性阴道炎 (aerobic vaginitis, AV)^[3-6]、萎缩性阴道炎 (senile vaginitis)^[7-9] 和部分细菌性阴道病 (bacterial vaginosis, BV)^[10-12] 的发生有着密切的联系, 是除大肠埃希氏菌外另一重要的感染菌。生物膜 (biofilm) 主要由多糖、蛋白质、核酸类物质组成, 是一种在非生物或生物表面黏附的微生物附着群落。生物膜结构的形成可以增强细菌对于抗生素的耐受能力, 并且有助于细菌免受机体免疫防御系统的攻击及免疫吞噬作用, 与慢性、持续性感染疾病的发生发展有着密切的联系^[13-15]。苦参总碱是苦参的主要活性组分, 具多种药理活性, 包括抗炎、抗病毒、抗心律失常、抗肿瘤等, 被广泛应用于感染、肿瘤、心血管疾病等多种疾病领域^[16]。此前有报道证实, 苦豆子中提取的苦参总碱对表皮葡萄球菌生物膜具有抑制作用^[17]。本研究主要通过对体外表皮葡萄球菌生物膜的测定, 进一步确证苦参总碱对表皮葡萄球菌生物膜的抑制作用, 并探究其对表皮葡萄球菌氧化胁迫的耐受力及乳酸敏感性的影响, 以期苦参总碱的临床用药提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 菌株与培养基

表皮葡萄球菌 SE1457, 由中国科学院上海药物研究所馈赠; 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 培养基 (购于英国 OXOID 公司)。

1.2 试剂

苦参总碱 (妇科感染外用中成药苦参凝胶的原料药, 批号 170203, 含苦参总碱以氧化苦参碱计 78.3%, 贵阳新天药业股份有限公司提供); 结晶紫粉末购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 乳酸购于国药集团化学试剂有限公司; 双氧水溶液购于美国 Sigma 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (RNeasy mini kit) 购于德国 Qiagen 公司; 逆转录聚合酶链反应试剂盒购于日本 Takara 公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒购于日本东洋纺绩株式会社。

2 方法

2.1 结晶紫染色法检测生物膜形成

参照 Chrietensen 等^[18]方法根据具体实验操作稍作改动。使用无菌 TSB 培养基培养 (37 °C 振荡) 表皮葡萄球菌至对数生长期, 以 1 : 1 000 比例稀释菌液, 设置实验组 (TSB 培养基稀释的不同质量浓度的苦参总碱药液, 质量浓度分别为 5、10、15 mg/mL) 及阴性对照组 (等体积生理盐水), 将菌液滴加至无菌的 96 孔板中, 每孔 200 μ L, 每组设置 5 个复孔, 置于 37 °C 恒温培养箱中继续培养 24 h。从培养箱中取出 96 孔板, 用移液器小心吸出培养基, 每孔加入 200 μ L 无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行洗涤, 重复洗涤 3 次以除去未黏附菌。室温干燥后每孔加入 200 μ L 99% 甲醇溶液, 室温下固定 15 min, 弃去固定液。室温干燥后每孔加入 200 μ L 的 2% 结晶紫染液, 室温下孵育 20 min。用去离子水轻轻洗涤, 以去除残留的结晶紫染液, 使用酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度 (*A*) 值。

2.2 刚果红实验检测生物膜形成

参照 Arciola 等^[19]方法配制刚果红培养基 (刚果红 0.8 g/L、脑心浸液干粉 37 g/L、蔗糖 36 g/L、琼脂粉 20 g/L), 在实验组中加入苦参总碱药液, 质量浓度为 5、10、15 mg/mL; 阴性对照组中加入同体积的生理盐水溶液。使用无菌 TSB 培养基培养表皮葡萄球菌至对数生长期, 将菌液在上述配制好的刚果红平板中进行划线培养, 并将平板置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 待菌落形成后转移至室温下继续培养 24~72 h。仔细观察和记录细菌菌落的颜色, 若生物膜为阳性, 则观察到的菌落为黑色, 若生物膜为阴性, 则观察到的菌落颜色为红色^[9]。

2.3 扫描电镜观察生物膜

实验组 TSB 培养基中加入苦参总碱, 终质量浓度为 15 mg/mL。TSB 培养基滴加至无菌培养皿中, 按照 1 : 1 000 比例接种表皮葡萄球菌菌液。培养皿中各放入 2 块盖玻片, 37 °C 静置培养约 14 h 后, 移液器弃除液体培养基, 并用灭菌的 PBS 漂洗 3 次, 加入 2.5% 戊二醛, 4 °C 静置过夜。用移液器弃除戊二醛, 灭菌的 PBS 漂洗 3 次。用 20%、50%、80%、100% 的乙醇进行梯度脱水, 每次脱水 10 min。移液器弃除平皿中的液体, 室温晾干后放到 2% 的戊二醛里浸泡 2 h, 二甲砷酸钠洗涤 2 次, 1% 的锇酸浸泡 2 h, 用 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇进行梯度脱水。转入中间液中进行置换, 后移至临界

点干燥仪中进行干燥,使用离子溅射仪对样品进行表面镀金处理,最后用 QUANTA FEC 250 环境扫描电子显微镜(荷兰飞利浦公司)进行观察^[20]。

2.4 表皮葡萄球菌对氧化胁迫的耐受性和对乳酸的敏感性测定

无菌 TSB 培养基培养表皮葡萄球菌至对数生长期,设置实验组(无菌 TSB 培养基溶解并稀释的苦参总碱药液,质量浓度分别为 5、10、15 mg/mL)、阴性对照组(等体积生理盐水)。在实验组和阴性对照组培养基中加入过氧化氢或乳酸,并使用倍半稀释的方法对过氧化氢或乳酸进行稀释,在无菌 96 孔板中,每孔滴加 50 μ L。用实验组或对照组培养基以 1:1 000 比例稀释菌液,在无菌 96 孔板中每孔滴加菌液 50 μ L,混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h。期间观察并记录细菌的存活状态。

2.5 实时定量 PCR (qRT-PCR) 法检测表皮葡萄球菌氧化应激响应基因的表达

使用无菌 TSB 培养基培养表皮葡萄球菌至对数生长期,设置实验组(TSB 培养基溶解并稀释苦参总碱药液,质量浓度分别为 5、10、15 mg/mL)、阴性对照组(不含苦参总碱药液的 TSB 培养基),将细菌菌液分别用实验组和对照组的培养基以 1:1 000 比例稀释,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 8 h,收集细菌菌液,提取总 RNA,参照 RNeasy mini kit (Qiagen) 试剂盒步骤操作,将总 RNA 逆转录成 cDNA,参照 PrimeScript[®] RT reagent Kit (Takara) 试剂盒步骤操作,使用 qRT-PCR 法(参照 THUNDERBIRD SYBR qRT-PCR 试剂盒步骤操作)检测苦参总碱作用前后相关基因转录水平变化。引物序列见表 1,其中内参基因为 *gyrB*,目的基因为 *serp2195*、*gpxA-2*^[20]。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

基因	上游引物	下游引物
<i>gyrB</i>	5'-TTATGGTGCTGGACAGATACA-3'	5'-CACCGTGAAGACCGCCAGATA-3
<i>serp2195</i>	5'-CCATTTGTCTTCCGAATGGT-3'	5'-GCCCATATCCTTGGATTGAA-3
<i>gpxA-2</i>	5'-TTTGCGAACCAATAATCCTG-3'	5'-TGAGCTTCCCTTGCAATGAT-33

3 结果

3.1 苦参总碱对表皮葡萄球菌生物膜的抑制作用

通过结晶紫染色法检测表皮葡萄球菌胞外黏附基质的变化,结果如图 1 所示。与阴性对照组相比,苦参总碱在 5.0 mg/mL 质量浓度下作用于表皮葡萄球菌后即可显著性降低结晶紫染色后的 *A* 值($P < 0.001$),且随着苦参总碱质量浓度的继续增加,抑制

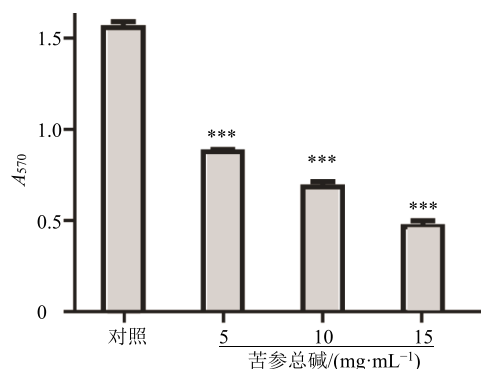
作用更显著,且呈质量浓度依赖性。表明苦参总碱对于表皮葡萄球菌生物膜的形成具有显著的抑制作用。

刚果红实验结果如图 2 所示。可见阴性对照组中表皮葡萄球菌菌落密集且呈黑色,表明其形成生物膜的能力较强。而苦参总碱各质量浓度组中表皮葡萄球菌菌落稀疏且呈红色,表明其生物膜形成的能力受到明显的抑制。

扫描电镜检测结果如图 3 所示。阴性对照组表皮葡萄球菌菌落层层叠叠聚集簇,表明有明显的生物膜形成;与阴性对照组相比,经苦参总碱(15 mg/mL)作用后,表皮葡萄球菌菌体散在分布,基本无成簇聚集的细菌,表明其生物膜的形成受到了破坏。

3.2 苦参总碱增强了表皮葡萄球菌对过氧化氢的敏感性

阴性对照组在没有加入苦参总碱时,表皮葡萄球菌对过氧化氢耐受程度为 5.0~10.0 μ mol/L。加入苦参总碱后,表皮葡萄球菌对过氧化氢耐受程度降低。在苦参总碱 15 mg/mL 质量浓度条件下,表皮葡萄球菌对过氧化氢耐受力降低为 0.63~1.25 μ mol/L,对氧化胁迫耐受性与阴性对照组相比下降了 8 倍。结果见表 2。



与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

图 1 结晶紫染色检测细菌胞外黏附基质

Fig. 1 Crystal violet staining for extracellular adhesion matrix

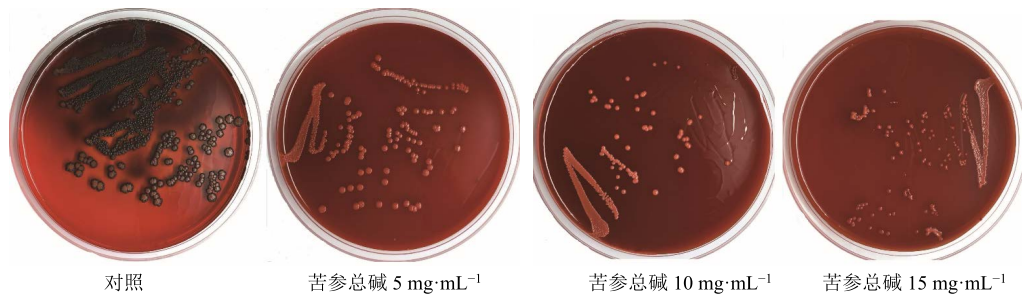


图 2 刚果红实验检测表皮葡萄球菌生物膜
Fig. 2 Biofilms of *Staphylococcus epidermidis* detected by Congo red test

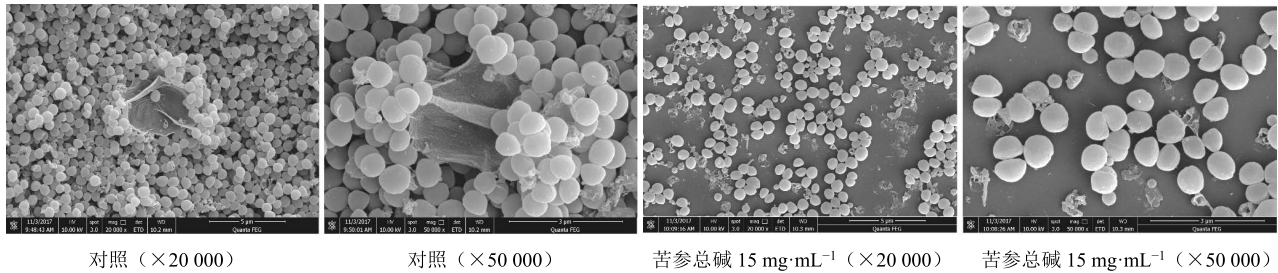


图 3 扫描电镜检测表皮葡萄球菌生物膜
Fig. 3 Detection of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by scanning electron microscope

表 2 表皮葡萄球菌对过氧化氢的耐受性

Table 2 Tolerance of *Staphylococcus epidermidis* to hydrogen peroxide

组别	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	过氧化氢耐受性				
		$10.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$5.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$2.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$1.25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.63\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
阴性对照	—	—	+	+	+	+
苦参总碱	5	—	—	—	+	+
	10	—	—	—	+	+
	15	—	—	—	—	+

“+” 有细菌生长; “-” 无细菌生长, 下表同
“+” with bacteria growth; “-” no bacteria growth, same as following table

3.3 苦参总碱增强了表皮葡萄球菌对乳酸的敏感性

阴性对照组在没有加入苦参总碱或苦参总碱较低质量浓度 (5 mg/mL) 时, 表皮葡萄球菌对乳酸耐受程度为 0.4%~0.8%。在苦参总碱 15 mg/mL 质量浓度条件下, 表皮葡萄球菌对乳酸耐受程度降低为 0.05%~0.10%, 对乳酸敏感性与阴性对照组相比增强了 8 倍。结果见表 3。

3.4 苦参总碱抑制氧化应激基因转录

表皮葡萄球菌受到氧化胁迫时, 氧化应激响应基因 *serp2195*、*gpxA-2* (分别编码二氢硫辛酰胺脱氢酶和编码谷胱甘肽过氧化物酶, 是具有还原过氧化物和消除氧化压力作用的 2 种蛋白酶) 的转录水

表 3 表皮葡萄球菌对乳酸的耐受性

Table 3 Tolerance of *Staphylococcus epidermidis* to lactic acid

组别	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	乳酸耐受性				
		0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%
对照	—	—	+	+	+	+
苦参总碱	5	—	+	+	+	+
	10	—	—	—	—	+
	15	—	—	—	—	+

平明显升高。与阴性对照组相比, 苦参总碱能够抑制 *serp2195* 及 *gpxA-2* 基因的转录, 在 15 mg/mL 条件下, *serp2195* 基因的相对转录水平下降了 30.9%, *gpxA-2* 基因的相对转录水平降低了 27.7%。提示苦

参总碱可能通过下调这 2 个基因的转录水平,从而增强了表皮葡萄球菌对氧化胁迫的敏感性。结果见图 4。

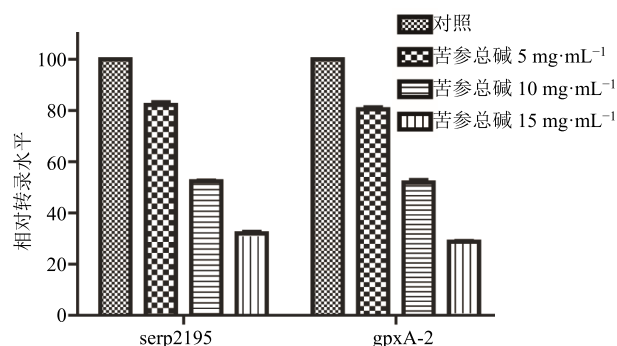


图 4 氧化应激响应基因 *serp2195* 和 *gpxA-2* 转录水平

Fig. 4 Transcriptional levels of oxidative stress response genes *serp2195* and *gpxA-2*

4 讨论

表皮葡萄球菌属于人体正常菌群,是构成女性阴道菌群的重要成员,当在外源及内源等多种因素的影响下会引起阴道内的菌群失调,从而导致阴道菌群及与人体之间的微生态平衡状态受到破坏,机体感染其他疾病的机率增加,是女性常见的妇科炎症性疾病发生发展的重要原因之一^[2-13]。表皮葡萄球菌通常凝固酶呈阴性,具有较弱的致病能力,而其致病性主要与其产生细菌生物膜和其他毒力因子相关^[1],当机体的局部防御功能受到损伤或女性因衰老、哺乳等其他原因造成雌激素水平下降时,其分泌的大量的胞外多糖黏质物质将会抑制机体的免疫应答作用,使得表皮葡萄球菌的感染病程延长^[2]。此外,表皮葡萄球菌作为兼性厌氧菌在温度 28~38 ℃、pH 值 4.5~9.8 的环境中均能够生长,又增强了它的致病性及致病范围。目前,已有研究表明造成表皮葡萄球菌机会感染和耐药性增高的主要原因还是抗生素药物的长期大量使用^[21]。

正常情况下阴道微生态系统是以乳酸杆菌等优势菌群为主组成的^[22]。在雌激素作用下,阴道上皮细胞内所含有的丰富的糖原,被阴道内的优势菌乳酸杆菌分解为乳酸和过氧化氢,一方面可以维持正常的阴道酸性环境(pH 值多在 3.8~4.4),使适应于在弱碱性环境中繁殖的表皮葡萄球菌等病原体受到抑制;另外一方面可以抑制或者杀死对广谱抗菌物质过氧化氢敏感的病原体^[23]。研究表明^[24],以苦参总碱为主要成分的苦参凝胶可以促进阴道乳酸杆

菌的增殖。同时本实验研究结果表明苦参总碱可以降低条件致病菌对乳酸的耐受性和增加其对过氧化氢的敏感性。综合分析可得出,苦参总碱可以促进恢复阴道微生态平衡的恢复。

目前,细菌生物膜也是阴道炎的一个新治疗靶点,其在阴道炎的发病和治疗过程中扮演重要角色^[25]。由细菌所分泌的多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等物质可将细菌自身进行包裹而形成的大量细菌聚集膜样,即形成细菌生物膜结构^[14-15]。在阴道炎中,细菌生物膜在阴道炎的持续感染和复发过程中发挥了重要作用^[12-13]。因此,生物膜的治疗已经成为目前治疗阴道炎复发和耐药的热点,临床迫切需要可以靶向清除阴道病原体及其生物膜的新型抗微生物制剂^[25]。该研究中,苦参总碱对表皮葡萄球菌生物膜有较强的抑制作用,为临床治疗难治性阴道炎的药物提供新思路。

苦参为我国常用中药,具有清热燥湿、杀虫、利尿的功效,其提取物苦参总碱主要成分为苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱和氧化槐果碱等。以苦参总碱作为主要原料药的苦参凝胶,在临床上主要用于治疗细菌性阴道病、滴虫性阴道炎、外阴阴道假丝酵母菌病、萎缩性阴道炎等妇科慢性炎症。大量的研究表明,苦参凝胶在治疗上述妇科慢性炎症方面有较好的疗效,且无不良反应发生^[26]。另有研究表明苦参凝胶对需氧菌性阴道炎有较好疗效^[24]。本研究分别通过结晶紫染色半定量黏附实验和刚果红实验证实了苦参总碱可显著性抑制体外培养表皮葡萄球菌的生物膜,且抑制作用具有质量浓度依赖性,可以在一定程度上为解释苦参总碱抗菌消炎的作用机制提供依据。另外,当表皮葡萄球菌生物膜受到抑制后,通过产生过氧化氢来抵御宿主免疫系统的攻击,对病原体产生氧化胁迫^[27]。本研究使用双氧水过氧化氢模拟氧化胁迫,证实表皮葡萄球菌生物膜在受到苦参总碱抑制后,对过氧化氢耐受明显下降。qRT-PCR 实验结果显示苦参总碱作用后氧化应激响应基因 *serp2195*、*gpxA-2* 转录水平平均下调,进一步表明病原体抵御氧化胁迫攻击的机制可能与下调表皮葡萄球菌氧化应激响应基因 *serp2195* 和 *gpxA-2* 的转录水平相关。且已有研究表明这 2 个基因的表达主要受 *abfr* 基因的调控(生物膜形成相关基因)^[20],而苦参总碱是否通过影响 *abfr* 基因的表达而调控 *serp2195* 和 *gpxA-2* 转录水平,抑制细菌生物膜的形成,还有待进行深入研究。

本研究观察了苦参总碱对细菌生物膜的抑制作用,为苦参总碱临床应用提供了重要的科学依据,为解释由表皮葡萄球菌引起的萎缩性阴道炎、需氧菌性阴道炎以及部分细菌性阴道炎的作用机制提供依据,但对细菌性阴道炎和外阴阴道假丝酵母菌病等阴道炎的主要致病菌的细菌生物膜的抑制作用尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Dortet L, Glaser P, Kassis-Chikhani N, *et al.* Long-lasting successful dissemination of resistance to oxazolidinones in MDR *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates in a tertiary care hospital in France [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(1): 41-51.
- [2] Amato A, Migneco L M, Martinelli A, *et al.* Antimicrobial activity of catechol functionalized-chitosan versus *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Carbohydr Polymers*, 2018, 179: 273-281.
- [3] Donders G G G, Vereecken A, Bosmans E, *et al.* Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis [J]. *BJog Int J Obstetrics Gynaecol*, 2002, 109(1): 34-43.
- [4] Fan A, Yue Y, Geng N, *et al.* Aerobic vaginitis and mixed infections: Comparison of clinical and laboratory findings [J]. *Arch Gynecol Obstetrics*, 2013, 287(2): 329-335.
- [5] Tempera G, Furneri P M, Donders G G G. Management of aerobic vaginitis [J]. *Gynecol Obstetric Invest*, 2010, 70(4): 244.
- [6] Donders G, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy [J]. *BJOG*, 2011, 118(10): 1163-1170.
- [7] 张清学, 王良岸, 邝健全. 萎缩性阴道炎阴道菌群的研究 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 1999, 20(3): 231-233.
- [8] 张清学, 王良岸, 王文军, 等. 萎缩性阴道炎的临床观察及阴道需氧菌菌群研究 [J]. 实用妇产科杂志, 2001, 17(1): 36-37.
- [9] 吴文湘, 刘朝晖, 廖秦平, 等. 康妇特栓治疗老年性阴道炎的临床研究 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2005, 6(3): 181-184.
- [10] 李燕子. 180 例老年细菌性阴道炎的细菌培养及结果分析 [J]. 实用医技杂志, 2008, 15(12): 1546-1547.
- [11] 吕春兰, 丁志红, 张有忠, 等. 老年细菌性阴道炎患者致病菌分布与耐药性调查与分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(5): 549-551.
- [12] 梁丽杰. 细菌性阴道炎 93 例临床分析 [J]. 中外妇儿健康: 学术版, 2011, 19(1): 32.
- [13] Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(10): 2675-2679.
- [14] Davies D G, Parsek M R, Pearson J P, *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm [J]. *Science*, 1998, 280(5361): 295-298.
- [15] McDougald D, Rice S A, Barraud N, *et al.* Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(1): 39-50.
- [16] 张玉军. 苦参的近代药理及临床研究进展 [J]. 中华医学实践杂志, 2005, 4(7): 697.
- [17] Li X, Guan C, He Y, *et al.* Effects of Total Alkaloids of *Sophora alopecuroides* on biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* [J]. *BioMed Res Int*, 2016, 2016(3): 1-10.
- [18] Christensen G D, Simpson W A, Bison A L, *et al.* Adherence of slime-producing *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces [J]. *Infect Immun*, 1982, 37(1): 318-326.
- [19] Arciola C R, Campoccia D, Gamberini S, *et al.* Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(21): 4233-4239.
- [20] Liu X, Sun X, Wu Y, *et al.* Oxidation-sensing regulator AbfR regulates oxidative stress responses, bacterial aggregation, and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(6): 3739-3752.
- [21] 李燕, 李冬冬, 陶传敏, 等. 表皮葡萄球菌生物膜形成及相关基因的检测及评价 [J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(4): 473-476.
- [22] Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens [J]. *Fems Immunol Med Microbiol*, 2006, 48(1): 75-83.
- [23] Strus M, Brzychczywłoch M, Gosiewski T, *et al.* The *in vitro* effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. [J]. *Fems Immunol Med Microbiol*, 2006, 48(1): 56-63.
- [24] Wang X, Li J, Hu Y, *et al.* Effect of *Sophora flavescens* alkaloid on aerobic vaginitis in gel form for local treatment [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(3): 314-320.
- [25] 蒋学风, 罗新. 生物膜与阴道炎症 [J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(2): 146-148.
- [26] 刘东泽, 胡珍真, 张萍, 等. 苦参凝胶药理作用与临床研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(11): 96-98.
- [27] Kala C, Ali S S, Mohd A, *et al.* Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and *in vitro* anti-arthritic potential of *Costus speciosus* Rhizome extract [J]. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 2015, 7(2): 383-389.