

黄绵马酸 BB 联合红霉素抑制表皮葡萄球菌及其生物被膜的形成研究

蔡芝玲¹, 莫梓童¹, 郑诗倩¹, 谢胜军¹, 蓝诗华¹, 沈志滨^{1,2,3*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省局精准药物递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

3. 广东省化妆品工程技术研究中心, 广东 广州 510006

摘要:目的 探讨黄绵马酸 BB 与红霉素联用对表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, SE) 抑菌活性和生物被膜形成的作用, 为黄绵马酸 BB 开发成为一种新型的生物被膜抑制剂提供理论基础。方法 采用微量稀释法分别测定黄绵马酸 BB 与红霉素联用对 11 株 SE 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), 并采用微量棋盘稀释法测定联合用药的部分抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI) 与最低抑膜浓度 (minimum biofilm inhibitory concentration, MBIC); 采用时间-杀菌曲线法, 评价联合用药对 SE 的动态杀菌作用; 通过二甲氧喹黄 [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[carbonyl(phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide, XTT] 比色法、半定量黏附实验和扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察, 评价联合用药对生物被膜形成各阶段的清除作用; 采用 qRT-PCR 技术检测生物被膜形成相关基因表达的变化, 探索联合用药可能的分子机制。结果 黄绵马酸 BB 与红霉素联用的 FICI 为 $(0.51 \pm 0.00) \sim (0.75 \pm 0.05)$, 表现为相加作用; 联合用药对受试菌呈动态抑制和杀灭作用, 整体呈相加作用; 生物被膜形成的各阶段, 联合用药组均可显著抑制受试菌的代谢活性及生物被膜总量的形成, 并减少细菌量及胞外聚合物的形成。联合用药组在耐药菌株 SE04 的生物被膜形成的各阶段均下调基因 *aap* 及 *sarA* 的表达, 并上调基因 *agrA* 的表达; 对于敏感菌株 SE08, 在生物被膜形成的各阶段均下调 *aap*、*sarA* 的表达, 在黏附及聚集期上调 *agrA* 的表达。结论 黄绵马酸 BB 与红霉素联用可以有效抑制 SE 及其生物被膜的形成, 并呈相加作用。抗生物被膜效应与抑制细菌代谢活性、生物被膜总量以及生物被膜形成相关基因的表达有关。

关键词: 香鳞毛蕨; 黄绵马酸 BB; 表皮葡萄球菌; 生物被膜; 联合用药

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)08-2417-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.019

Antibacterial and antibiofilm effects of flavaspidic acid BB combined with erythromycin on *Staphylococcus epidermidis*

CAI Zhi-ling¹, MO Zi-tong¹, ZHENG Shi-qian¹, XIE Sheng-jun¹, LAN Shi-hua¹, SHEN Zhi-bin^{1,2,3}

1. School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Provincial Engineering Center of topical precise drug delivery system, Guangzhou 510006, China

3. Guangdong Provincial Cosmetics Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To explore the antibacterial and antibiofilm effects of flavaspidic acid BB combined with erythromycin on *Staphylococcus epidermidis* (SE), and to provide the theoretical basis for the development of flavaspidic acid BB into a new type of antibacterial drug. **Methods** The microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of flavaspidic acid BB and erythromycin against 11 strains of SE. And the antimicrobial susceptibility against the strains were evaluated with fractional inhibitory concentration index (FICI) and the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) of flavaspidic acid BB combined with erythromycin by chessboard dilution method. By drawing a time-kill curve, the dynamic bactericidal effect of flavaspidic acid BB combined and erythromycin on SE was evaluated. XTT colorimetric method, semi-quantitative adhesion test and scanning electron microscope (SEM) were used to evaluate the scavenging effect of the combined drug on the biofilm of the strains.

收稿日期: 2021-10-20

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化”重点专项项目 (2018YFC1707100)

作者简介: 蔡芝玲 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药提取分离技术与应用。E-mail: cc34293821@qq.com

*通信作者 沈志滨 (1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础及新药研发。E-mail: szb8113@126.com

The expression changes of biofilm formation related genes (*sarA*, *aap*, *agrA*) were detected by qRT-PCR. **Results** FICI value of BB and erythromycin ranged from (0.51 ± 0.00) to (0.75 ± 0.05) , which showed additive effect. According to the time-kill curve, the combination of drugs could effectively inhibit and kill the SE. In each stage of biofilm formation, the combination drug group could significantly inhibit the metabolic activity of the tested bacteria and the formation of biofilm substrate quality, and reduce the amount of bacteria and the adhesion between bacteria and inhibit the formation of extracellular polymer. For resistant strain SE04, the expressions of *aap* and *sarA* genes were down-regulated and *agrA* gene expression was up-regulated at each stage of biofilm formation in drug combination group. For sensitive strain SE08, drug combination group could down-regulate the expression of *aap* and *sarA* genes at all stages, and up-regulate the expression of *agrA* gene at adhesion and aggregation stages. **Conclusion** The combination of flavaspodic acid BB and erythromycin has good antibacterial and antibiofilm effects on SE, which showed additive effect. The antibiofilm effect is associated with inhibiting bacterial metabolic activity, formation of biofilm substrate quality, and the expression of genes related to biofilm formation.

Key words: *Dryopteris fragrans* (L.) Schott.; flavaspodic acid BB; *Staphylococcus epidermidis*; biofilm; drug combination

皮肤及软组织感染 (skin and soft tissue infections, SSTI) 是临床十分常见的疾病。根据 SSTI 的流行病学统计的结果可知, SSTI 致病菌以葡萄球菌最多^[1], 其中表皮葡萄球菌为主要致病菌之一。随着广谱抗菌药物在临床的广泛应用, SSTI 的耐药性持续上升, 大大提高了临床疾病的难愈性和治疗成本。而红霉素 (erythromycin)、莫匹罗星等抗生素作为治疗皮肤和浅表外伤感染的局部外用抗菌药物, 其耐药菌株逐渐增加^[2]。细菌耐药的主要原因之一是病原体能够形成难以清除的生物被膜, 使得药物不能有效治疗其导致的相关感染^[3]。生物被膜大多数被定义为一种细胞微生物群落, 其嵌在胞外聚合物质的基质中, 具有稳定结构和特定功能, 是微生物适应环境生存的一种生存模式。生物被膜的形成过程可分为 4 个阶段, 主要为初黏附阶段、菌落聚集形成阶段、生物被膜成熟阶段及生物被膜脱落阶段。研究发现, 处于生物被膜内的细菌与浮游菌相比, 其耐药性提高 10~1000 倍^[4]。目前, 生物被膜抑制剂是目前国外抗生素研究的一个新方向, 抗生素与生物被膜抑制剂联合应用, 可以减少用药量, 提高临床治疗效果^[5]。因此, 寻找生物被膜抑制剂作为新药研发具有重要意义。

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. 为鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物, 民间常被用于治疗各种皮肤疾病, 如牛皮癣、皮炎和皮疹。根据药理学研究, 香鳞毛蕨具有抗菌、抗过敏、抗关节炎、抗肿瘤、抗氧化等多种药理活性^[6], 尤其抗菌活性显著, 且发挥该作用的主要成分为间苯三酚类化合物。研究显示, 香鳞毛蕨中所含的间苯三酚类化合物黄绵马酸 BB 具有良好的抗菌活性^[7]。然而, 有关黄绵马酸 BB 联合抗生素的抗菌活性以及对生物被膜的抑制

作用尚未见报道。本研究通过测定黄绵马酸 BB 联用抗生素对耐药和敏感表皮葡萄球菌的抑菌活性及其生物被膜的抑制作用, 为黄绵马酸 BB 开发成为一种新型的抗菌药物提供理论基础。

1 材料

1.1 药品

黄绵马酸 BB (批号 GC-CZ-180906, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自武汉长成化成科技发展有限公司; 红霉素 (批号 N0825A) 购自大连美仑生物技术有限公司; 头孢唑啉 (批号 190501) 购自广东华南药业集团有限公司; 二甲氧喹黄 [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[carbonyl(phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide, XTT, 批号 CX30182035] 购自北京酷来搏科技有限公司; Vit.K3 (批号 C1517035) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; CAMHB 营养肉汤培养基 (批号 20200513)、营养琼脂培养基 (批号 20201117) 和胰蛋白胍大豆肉汤培养基 (TSB, 批号 1090952) 均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 仪器

SW-CJ-1F 超净工作台 (苏净集团安泰公司); iMark 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司); Memmert 恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); BKQ-Z301 立式压力蒸汽灭菌锅 (山东博科消毒设备有限公司); CHA-S 恒温振荡器 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); JSM-7610F Plus 场发射扫描电子显微镜 (日本电子株式会社)。

1.3 菌株

表皮葡萄球菌临床分离菌株 (*Staphylococcus epidermidis*), 共 11 株 (SE01~SE11), 由广东莱恩医药研究院有限公司赠予; 金黄色葡萄球菌质控菌

株 (*Staphylococcus aureus*, ATCC@29213) 购自广东省微生物菌种保藏中心。

2 方法

2.1 黄绵马酸 BB 与红霉素的抗菌活性测定

2.1.1 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的测定 根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI)^[8] 制定的 M07-A9 方案进行微量稀释法测定黄绵马酸 BB 与红霉素分别对 11 株表皮葡萄球菌 (SE01~SE11) 的 MIC 值, 参考 Ko 等^[9] 的方法, 将黄绵马酸 BB 和红霉素在 96 微孔板中进行二倍稀释至终质量浓度为 5120、2560、1280、640、320、160、80、40、20、10 $\mu\text{g/mL}$, 每孔含 100 μL 药液。于各孔中添加 100 μL 经 CAMHB 培养基稀释的 1×10^6 CFU/mL 菌悬液。同时设置只含 200 μL 菌悬液的生长对照组及只含 200 μL 培养基的空白对照组。于 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 18~24 h 后, 与生长对照组对比, 以肉眼观察无受试细菌生长的相应药物浓度为 MIC。

根据 CLSI 制定的 M07-A11 方案, 在进行药敏实验时需对实验过程及环境进行质量控制实验, 以金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC@29213) 作为质控 (quality control, QC) 菌株, 头孢唑林为质控药物。平行操作条件下, QC 菌株的 MIC 在 0.25~1.00 $\mu\text{g/mL}$, 则认定测定结果有效可信。

2.1.2 联合用药的部分抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI) 的测定 参考 Manalo 等^[10] 的方法并稍作修改, 用 CAMHB 培养基将黄绵马酸 BB 和红霉素分别进行梯度浓度稀释, 分别取 50 μL 药液接种于 96 微孔板中, 各孔再加入 100 μL 实验菌悬液 (1.0×10^6 CFU/mL)。最终在 96 微孔板中, 每一行包含梯度浓度递减的黄绵马酸 BB (4 MIC~1/16 MIC), 每一列含有梯度浓度递减的红霉素 (4 MIC~1/16 MIC), 同时设置只含菌液的生长对照组及只含培养基的空白对照组。于 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置培养 18~24 h 后, 与生长对照孔对比, 以肉眼观察无受试菌生长的相应药物浓度为其 MIC 值, 并根据 MIC 值计算 FICI。

结果评价标准^[11]: 以 FICI 值作为联合用药敏感实验的判断依据, $\text{FICI} \leq 0.5$ 为协同作用; $0.5 < \text{FICI} \leq 1.0$ 为相加作用; $1 < \text{FICI} \leq 2$ 为无关作用; $\text{FICI} > 2$ 为拮抗作用。

$$\text{FICI} = \text{MIC}_{\text{A 药联用}} / \text{MIC}_{\text{A 药单用}} + \text{MIC}_{\text{B 药联用}} / \text{MIC}_{\text{B 药单用}}$$

2.2 黄绵马酸 BB 联合红霉素对受试菌株时间杀菌曲线的测定

参考文献方法^[12] 采用活菌计数法, 黄绵马酸 BB 和红霉素分别稀释为 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、1/8 MIC 共 4 个浓度, 每个浓度相互联合进行杀菌曲线的绘制。不同浓度的药物以及不同组合浓度的药物加至含 1×10^6 CFU/mL 菌液浓度的 CAMHB 培养基中, 同时设置只含菌液的生长对照组。35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养, 分别在 0、2、4、6、8、12、24、48 h 取出, 采用平板稀释涂布法计算活菌数。绘制受试菌的时间杀菌曲线。

2.3 黄绵马酸 BB 和红霉素抗生物被膜活性的测定

将菌悬液 (1×10^6 CFU/mL) 接种于 96 微孔板中, 35 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温静置培养 24 h 后, 除去各孔培养基和浮游菌, 使用无菌 PBS 冲洗孔内形成的生物被膜。使用 TSB 培养基对药物进行梯度稀释, 黄绵马酸 BB 单药组为 1280~5 $\mu\text{g/mL}$, 红霉素单药组为 2560~10 $\mu\text{g/mL}$, 联合用药组按照“2.1.2”项方法进行药物稀释与组合。各组药物分别取 200 μL 加至生物被膜, 置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱继续培养 24 h, 观察结果。同时设置生长对照组及空白对照组。

结果判定标准: 以肉眼未见浑浊的最低药物浓度即为最低抑膜浓度 (minimum biofilm inhibitory concentration, MBIC)^[13]。

2.4 黄绵马酸 BB 联合红霉素对受试菌株生物被膜清除作用的测定

根据“2.3”项测定的 MBIC 结果, 确定最佳单药浓度和联合用药浓度。采用 XTT 比色法、半定量黏附实验和扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 共同评价药物对受试菌株生物被膜的清除作用。

2.4.1 XTT 比色法测定黄绵马酸 BB 联合红霉素对受试菌株生物被膜内细菌代谢活性的影响 含 1×10^6 CFU/mL 菌液浓度的 TSB 培养基接种于 96 微孔板中, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 6、24、48 h。于相应的时间段, 弃去各孔培养基和浮游菌, 进行 PBS 冲洗。SE04 菌株加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 黄绵马酸 BB 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素, SE08 菌株加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 黄绵马酸 BB 与 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素, 各 200 μL , 继续培养 24 h, 各孔加 100 μL XTT (0.5 mg/mL) / Vit.K3 (10 mmol/L) 混合液试剂, 35 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 h 后, 测定 450 nm 吸光度 (A_{450}) 值。同时设置生长对照组及空白对照组。

2.4.2 半定量黏附实验测定黄绵马酸 BB 联合红霉

素对受试菌株生物被膜总量的影响 按“2.4.1”项方法建立给药和不给药的 6、24、48 h 生物被膜, 甲醇固定 30 min 后弃去, 加入 0.1% 结晶紫染液, 染色 15 min 后洗去未黏附染料, 并采用 95% 乙醇溶解染料, 测定 570 nm 吸光度 (A_{570}) 值, 即为生物被膜总量。

2.4.3 SEM 观察黄绵马酸 BB 联合红霉素对受试菌株生物被膜微观结构的影响 参考 Schneider 等^[14]的方法, 在含 14 mm 无菌圆玻片的 24 微孔板上分别构建 6、24、48 h 的生物被膜, 并按照“2.4.1”项进行药物干预。2.5% 戊二醛固定生物被膜过夜后, 使用梯度浓度 (30%、50%、70%、80%、90%、95%) 乙醇进行梯度洗脱, 各梯度浓度共洗脱 2 次, 每次 15 min, 随后使用 100% 乙醇脱水 2 次, 每次 30 min。加入 100% 叔丁醇置换乙醇 2 次, 每次 30 min。冷冻真空干燥脱水样品, 进行喷金处理, 置于扫描电镜中观察。同时设置生长对照组。

2.5 黄绵马酸 BB 联合红霉素对生物被膜形成相关基因表达的影响

按“2.4.1”项方法建立给药或不给药的 6、24、48 h 生物被膜, 按照制造商的规程使用 Trizol 试剂提取 mRNA。随机取 5 例 RNA 样品 1 μ L, 用凝胶成像系统观察总 RNA 的 5S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 条带, 若 3 条条带完整即可证明总 RNA 抽提比较完整。然后使用 Prime Script TMRT reagent Kit 试剂盒进行逆转录反应。最后, 采用 SYBR Premix EX Taq II Kit 试剂盒配制反应体系进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 的数据结果以 16S rRNA 为内

参基因采用相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。mRNA 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

Table 1 Primer sequence of target gene

基因 ID	序列	长度/bp
<i>aap</i> -F	5'-TGTCCTATACCTCTATAGCCTTG-3'	104
<i>aap</i> -R	5'-CACCTAGTGCGAGCTGGTTTCAG-3'	
<i>atlE</i> -F	5'-ACAAATGCGTGACGAATGCA-3'	112
<i>atlE</i> -R	5'-GACGTCCTGAAGGTATCGTTGTT-3'	
<i>SarA</i> -F	5'-ATTATTGCTTCTGTGATACGGTTGT-3'	112
<i>SarA</i> -R	5'-ACGTAATGAACACGATGAAAGAACTG-3'	
<i>agrA</i> -F	5'-TGTCTTGAAACAGCACATACACGA-3'	97
<i>agrA</i> -R	5'-GAACGTACTGAATTACTTCCCG-3'	
16S rRNA-F	5'-GGCAAGCGTTATCCGGAATT-3'	101
16S rRNA-R	5'-GTTTCCAATGACCCTCCACG-3'	

2.6 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism software version 8.0 对数据进行统计学分析, 采用单因素方差分析法, 遵循 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 黄绵马酸 BB 与红霉素单独用药和联合用药的抗菌活性

如表 2 所示, 黄绵马酸 BB 与红霉素联合用药对 11 株受试菌株的 FICI 值范围为 $(0.51 \pm 0.00) \sim (0.75 \pm 0.05)$, 均在 0.5~1.0 的区间内, 说明黄绵马酸 BB 可增强红霉素对表皮葡萄球菌的抑制作用, 表现为相加作用。黄绵马酸 BB 和红霉素对菌株 SE04

表 2 黄绵马酸 BB 与红霉素联合药敏实验结果 ($n=3$)

Table 2 Results of combined susceptibility test of flavaspidic acid BB and erythromycin ($n=3$)

菌株 编号	黄绵马酸 BB/(μ g·mL ⁻¹)		红霉素/(μ g·mL ⁻¹)		FICI ($\bar{x} \pm s$)	作用效应
	MIC _单	MIC _{联用}	MIC _单	MIC _{联用}		
SE01	44.67	15.00	5 120.00	560.00	0.67 $\pm$ 0.22	相加
SE02	60.00	20.00	5 120.00	640.00	0.63 $\pm$ 0.00	相加
SE03	44.89	20.00	80.00	10.00	0.51 $\pm$ 0.00	相加
SE04	45.91	14.00	128.00	22.00	0.51 $\pm$ 0.00	相加
SE05	48.00	20.00	96.00	12.00	0.51 $\pm$ 0.00	相加
SE06	144.00	33.33	0.16	0.07	0.75 $\pm$ 0.05	相加
SE07	50.00	16.67	144.00	64.00	0.58 $\pm$ 0.06	相加
SE08	40.00	13.33	0.31	0.16	0.75 $\pm$ 0.18	相加
SE09	25.00	13.33	15.00	7.50	0.75 $\pm$ 0.00	相加
SE10	41.30	18.00	5 120.00	512.00	0.56 $\pm$ 0.10	相加
SE11	40.00	20.00	5 120.00	320.00	0.51 $\pm$ 0.00	相加

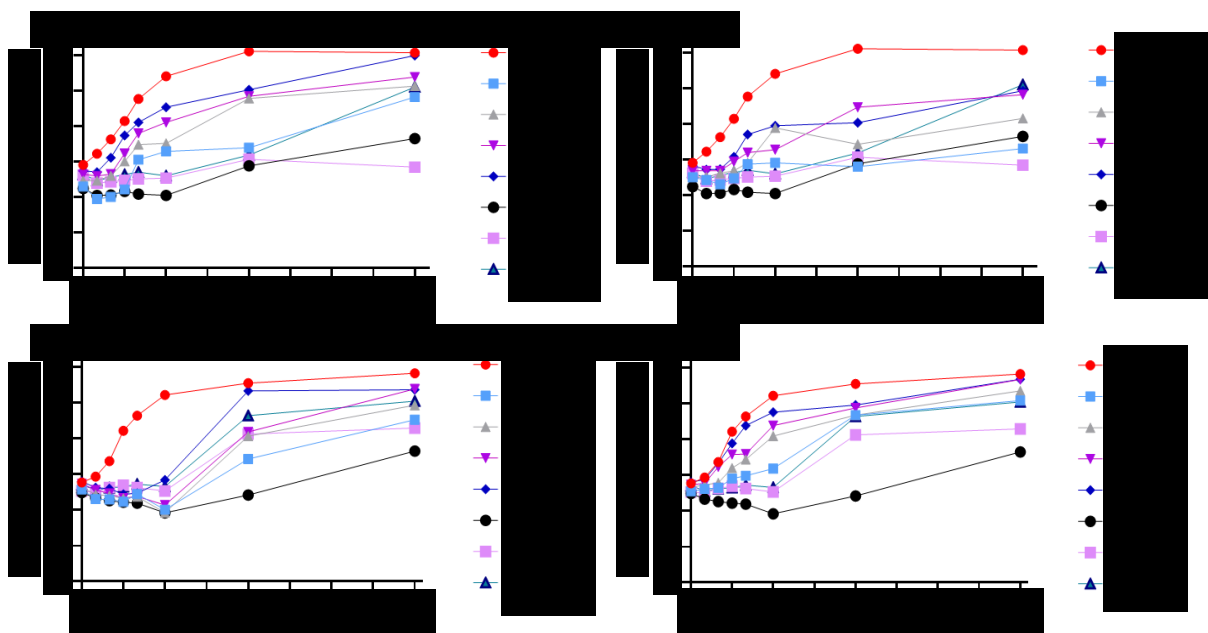
SE01~SE11 均为表皮葡萄球菌临床分离菌株, 共 11 株

SE01—SE11 were all clinical isolates of *Staphylococcus epidermis*, including 11 strains

单独用药的 MIC 分别为 45.91 $\mu\text{g/mL}$ 和 128.00 $\mu\text{g/mL}$ ，联合用药后分别降至 14.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 22.00 $\mu\text{g/mL}$ ；对于菌株 SE08，黄绵马酸 BB 和红霉素单独用药的 MIC 分别为 40.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.31 $\mu\text{g/mL}$ ，联合用药后二者分别降至 13.33 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.16 $\mu\text{g/mL}$ 。因此根据各单药组的 MIC 值以及联合用药后的 FICI 值，选择 1 株对红霉素耐药且联合效果较好的菌株（SE04）以及 1 株对红霉素敏感且联合效果较好的菌株（SE08）进行后续实验。

3.2 黄绵马酸 BB 联合红霉素对受试菌株时间杀菌曲线的影响

如图 1-A、B 所示，菌株 SE04 的生长对照组 4 h 后进入对数生长期，24 h 后进入成熟期，此后菌落数趋于平缓；黄绵马酸 BB 组和红霉素组在 0~4 h 菌落数持续下降，对菌落生长均有较好杀灭作用，12 h 后菌落数在逐渐上升，表明杀菌作用逐渐减弱，48 h 时菌落数基本趋于平衡，对比生长对照组的菌落数量均有轻微的下降。



A、B-SE04 菌株的时间-杀菌曲线 C、D-SE08 菌株的时间-杀菌曲线 BB-黄绵马酸 BB ERY-红霉素 B+E-黄绵马酸 BB+红霉素 1/2BB-1/2 MIC 的黄绵马酸 BB 1/4BB-1/4 MIC 的黄绵马酸 BB 1/8BB-1/8MIC 的黄绵马酸 BB 1/2ERY-1/2 MIC 的红霉素 1/4ERY-1/4MIC 的红霉素 1/8ERY-1/8 MIC 的红霉素 1/2B+E-1/2 MIC 的黄绵马酸 BB+1/2MIC 的红霉素 1/4B+E-1/4 MIC 的黄绵马酸 BB+1/4MIC 的红霉素 1/8B+E-1/8 MIC 的黄绵马酸 BB+1/8MIC 的红霉素

A and B-time-kill curves of SE04 strains C and D-time-kill curves of SE08 strains BB-flavaspicidic acid BB BB ERY-erythromycin B+E-flavaspicidic acid BB + erythromycin 1/2BB-1/2 MIC flavaspicidic acid BB 1/4BB-1/4 MIC flavaspicidic acid BB 1/8BB-1/8 MIC flavaspicidic acid BB 1/2ERY-1/2 MIC erythromycin 1/4ERY-1/4MIC erythromycin 1/8ERY-1/8 MIC erythromycin 1/2B + E-1/2 MIC flavaspicidic acid BB + 1/2 MIC erythromycin 1/4B + E-1/4 MIC flavaspicidic acid BB + 1/4 MIC erythromycin 1/8B + E-1/8 MIC flavaspicidic acid BB + 1/8 MIC erythromycin

图 1 黄绵马酸 BB 联合红霉素作用下对菌株 SE04 和 SE08 的时间-杀菌曲线

Fig. 1 Time-kill curve of flavaspicidic acid BB combined with erythromycin on SE04 and SE08

联合用药后的杀菌作用较各单药组好，其中 1/2B+E 组在 24 h 内有较好的抑制作用，较最有效的 1/2 MIC 两单药组菌落数下降了 1~2 lgCFU，根据文献评价标准^[15]，药物联用组菌落计数较最有效的单药组减少 ≥ 2 lgCFU，定义为协同作用；药物联用组菌落计数较最有效的单药组减少 1~2 lgCFU，定义为相加作用。因此，表明黄绵马酸 BB 联合红霉素抑制 SE04 菌株呈相加作用。

SE08 菌株的时间-杀菌曲线如图 1-C、D 所示，

生长对照组于 6 h 后进入对数生长期，24 h 后进入成熟期，此后菌落数趋于平缓。黄绵马酸 BB 组在 0~4 h 菌落数呈下降趋势，在 6~48 h 时菌落数量总体呈上升趋势，提示其杀菌作用随时间逐渐减弱。红霉素组在 0~24 h 菌落数缓慢持续的上升，到达 48 h 时菌落数量达到最大。与生长对照组比较，各单药组的菌落数量均有轻微下降。联合用药后整体的杀菌作用优于各单药组，其中联合用药组中 1/2B+E 的抑菌作用最佳，较最有效的单药组菌

落数下降了 1~2 lgCFU, 表明黄绵马酸 BB 联合红霉素抑制 SE08 菌株呈相加作用。

SE04 与 SE08 菌株的时间-杀菌曲线相比较可发现, 联合用药后 SE04 菌株的对数生长期延迟至 12 h, 成熟期延至 24 h; SE08 菌株的对数生长期延迟至 12 h, 48 h 内未出现成熟期。提示黄绵马酸 BB 联合红霉素对耐药或敏感菌株均具有延迟其生长的作用, 尤其对敏感菌株 SE08 的抑制作用更为明显。

3.3 黄绵马酸 BB 与红霉素单独用药和联合用药的抗生物被膜活性

结果如表 3 所示, 黄绵马酸 BB 和红霉素联合用药后, 对受试菌株 SE04 和 SE08 的生物被膜的 FICI 值分别为 0.19 ± 0.00 和 0.14 ± 0.00 , 均呈协同效应。并根据联合用药的 MBIC 值, 确定对

受试菌株 SE04 的最佳联用药物干预质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 黄绵马酸 BB 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素, 对 SE08 菌株的最佳联用药物干预质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 黄绵马酸 BB 与 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素, 后续实验以此质量浓度进行。

3.4 黄绵马酸 BB 联合红霉素对受试菌株生物被膜的清除效果

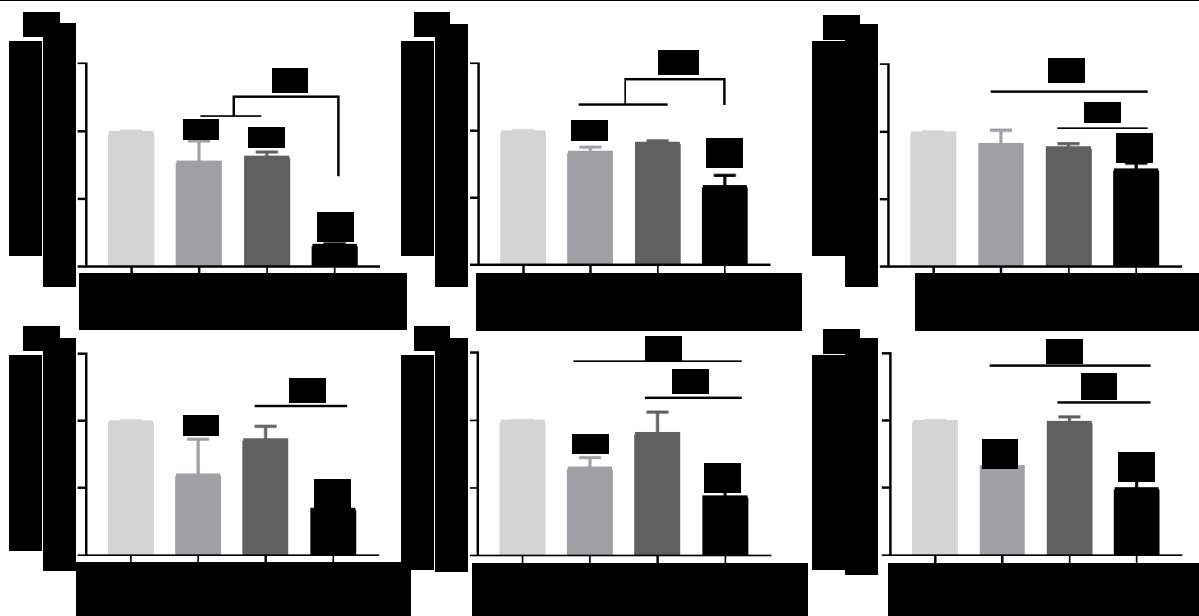
3.4.1 黄绵马酸 BB 联合红霉素对受试菌株生物被膜内细菌代谢活性的影响

如图 2-A~C 所示, 联合用药组各阶段生物被膜内细菌的代谢活性均显著低于生长对照组 ($P < 0.001$) 和各单药组 ($P < 0.05$, 0.001)。可见黄绵马酸 BB 与红霉素联用后可有效抑制 SE04 菌株生物被膜形成各阶段的膜内细菌代谢活性, 且比 2 种药物单独使用的效果好。

表 3 黄绵马酸 BB 与红霉素对表皮葡萄球菌的抗生物被膜活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Antimicrobial activities of flavaspilic acid BB and erythromycin against *Staphylococcus epidermidis* growing in biofilm ($\bar{x} \pm s, n=3$)

菌株编号	黄绵马酸 BB/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		红霉素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		FICI	作用效应
	MBIC 单	MBIC 联用	MBIC 单	MBIC 联用		
SE04	320.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	160.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	0.19 ± 0.00	协同
SE08	160.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	2.50 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.14 ± 0.00	协同



A~C-SE04 菌株的膜内细菌代谢活性 D~F-SE08 菌株的膜内细菌代谢活性 A、D-黏附阶段 (6 h) B、E-聚集阶段 (24 h) C、F-成熟阶段 (48 h) BB-黄绵马酸 BB ERY-红霉素 与生长对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与两单药组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 图 3、6、7 同

A—C-metabolic activities of bacteria in membrane of SE04 strains D—F-metabolic activities of bacteria in membrane of SE08 strains A and D-adhesion stage (6 h) B and E-aggregation stage (24 h) C and F-maturation stage (48 h) BB-luteimarate BB ERY-erythromycin * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs growth control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs two single drug groups, same as below fig. 3, 6, 7

图 2 XTT 比色法检测黄绵马酸 BB 联合红霉素对表皮葡萄球菌生物被膜形成各阶段细菌代谢活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

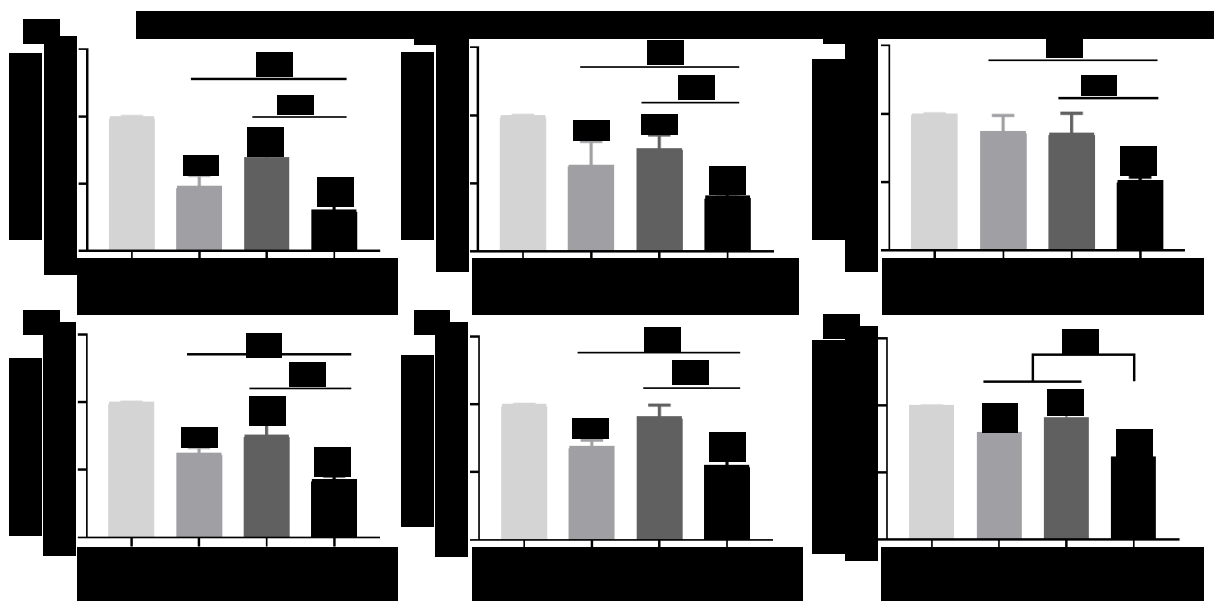
Fig. 2 Effect of flavaspilic acid BB combined with erythromycin on metabolic activity of *Staphylococcus epidermidis* at different stages of biofilm formation by XTT colorimetric assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

如图 2-D~F 所示,相较于生长对照组,联合用药组在各阶段均能有效降低生物被膜内细菌的代谢活性 ($P<0.001$);在黏附阶段,联合用药组的效果优于红霉素组 ($P<0.01$);在聚集和成熟阶段,联合用药组的作用效果均优于各单药组 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。可见黄绵马酸 BB 与红霉素联用后可有效抑制 SE08 菌株生物被膜形成各阶段的膜内细菌代谢活性,且效果优于 2 种药物单独使用。

SE04 与 SE08 菌株对比发现,分别与两单药组比较,联合用药对耐药菌株 SE04 的膜内细菌代谢活性的抑制作用优势阶段主要体现在黏附与聚集

期,敏感菌株 SE08 则在聚集与成熟期。

3.4.2 黄绵马酸 BB 联合红霉素对受试菌株生物被膜总量的影响 如图 3 所示,联合用药组在 SE04 与 SE08 菌株各阶段均可有效抑制生物被膜的形成,且效果均显著优于生长对照组 ($P<0.001$) 和各单药组 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。可见黄绵马酸 BB 与红霉素联用后可有效抑制 SE04 与 SE08 菌株各阶段生物被膜的形成,且比 2 种药物单独使用的效果好。随着生物被膜逐渐形成,联合用药对耐药菌株 SE04 和敏感菌株 SE08 生物被膜总量的清除作用均逐渐降低。



A~C-SE04 菌株的生物被膜总量 D~F-SE08 菌株的生物被膜总量
A—C-total amount of SE04 strains biofilm D—F-total amount of SE08 strains biofilm

图 3 半定量黏附实验检测黄绵马酸 BB 联合红霉素对表皮葡萄球菌生物被膜形成各阶段生物被膜总量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Effect of flavaspidic acid BB combined with erythromycin on total amount of *Staphylococcus epidermis* at different stages of biofilm formation by semi-quantitative adhesion experiment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

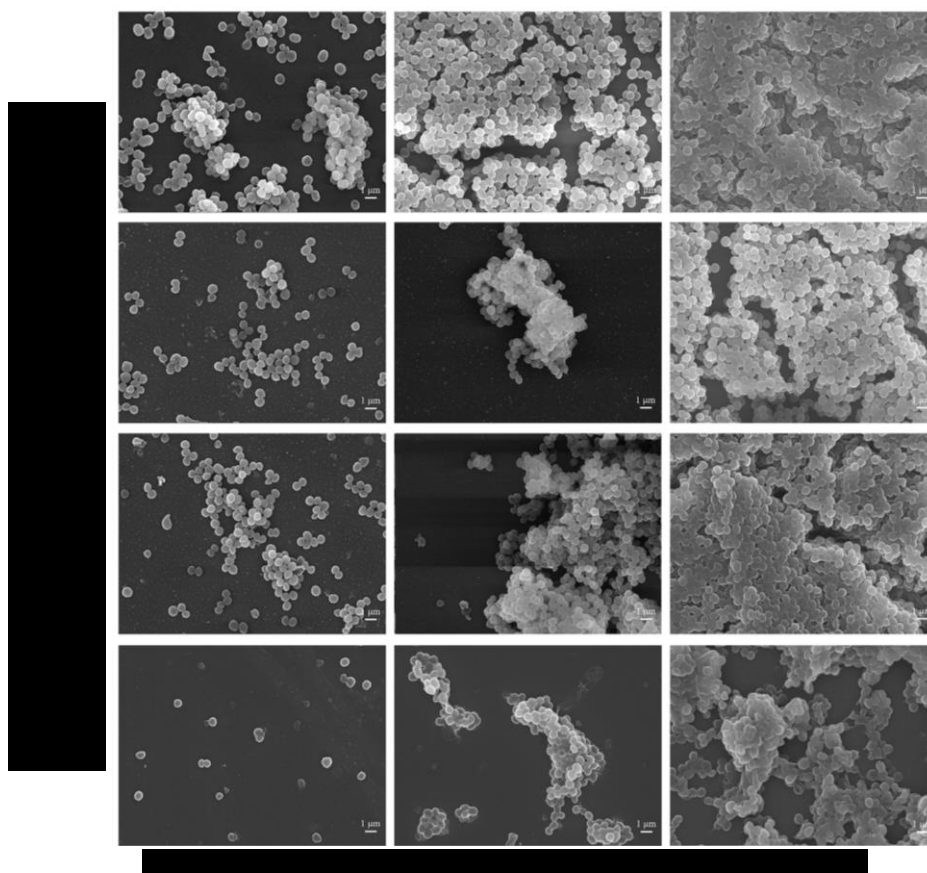
3.4.3 SEM 观察受试菌株生物被膜微观结构的变化 如图 4、5 所示,生长对照组在黏附阶段 (6 h) 呈正常卵圆状,大小均一且光滑,且细菌逐渐开始相互黏附成团。与生长对照组相比,黄绵马酸 BB 作用后,细菌量相对减少,细菌之间黏连减少;红霉素作用后无明显变化;联合用药组细菌量大幅度下降,细菌形态轻微变形,可观察到菌体破裂。在聚集阶段 (24 h),生长对照组微菌落相互聚集,胞间连接紧密,形成片状生物被膜。与生长对照组相比,黄绵马酸 BB 作用后,菌体部分破裂皱缩,仍可见胞外聚合物包裹在菌体外部;红霉素作用后效果不明显;联合用药组细菌量大幅度减少,细菌之间黏附较松散,可见少量细胞内容物渗出,生物被膜结构瓦解,菌体变形皱缩。在

成熟阶段 (48 h),生长对照组已经形成完整复杂的成熟生物被膜,细菌间连接紧密成簇状;各单药组膜内细菌形态结构完整;联合用药组细菌量大幅度下降,细菌之间黏连不成片,生物被膜结构趋向瓦解,细菌呈皱缩、凹陷等状态。

总体而言,黄绵马酸 BB 与红霉素联合用药对 SE04 和 SE08 菌株均表现出较好的生物被膜清除作用,且总体上优于两单药组。尤其在聚集与成熟期,联合用药对敏感菌株 SE08 的清除作用优于耐药菌株 SE04。

3.5 黄绵马酸 BB 联合红霉素对生物被膜形成相关基因表达的影响

如图 6 所示,在耐药菌株 SE04 的黏附和聚集阶段,与红霉素组相比,联合用药组可显著下调 *aap*



BB-20 $\mu\text{g/mL}$ 黄绵马酸 BB ERY-20 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素 BB + ERY-20 $\mu\text{g/mL}$ 黄绵马酸 BB + 20 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素

BB-20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ flavaspidic acid BB ERY-20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ erythromycin BB + ERY-20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ flavaspidic acid BB + 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ erythromycin

图 4 SEM 观察黄绵马酸 BB 联合红霉素对表皮葡萄球菌 SE04 生物被膜不同阶段微观结构的影响 ($\times 5000$)

Fig. 4 Effect of flavaspidic acid BB combined with erythromycin on microstructure of *Staphylococcus epidermis* SE04 at different stages of biofilm formation by SEM ($\times 5000$)

及 *sarA* 表达并上调 *agrA* 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)。且联合用药后对生物被膜形成各阶段的 *agrA* 基因和黏附阶段的 *aap* 基因的表达式的影响均显著高于两单药组, 具有统计学差异 ($P < 0.001$)。

如图 7 所示, 与生长对照组相比, 在敏感菌株 SE08 生物被膜形成的各阶段, 联合用药组均可显著下调 *aap*、*sarA* 的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 同时在黏附阶段显著上调 *agrA* 的表达 ($P < 0.001$)。其中, 联合用药组对生物被膜形成各阶段的 *sarA*、*agrA* 基因和黏附及聚集阶段的 *aap* 基因表达式的影响显著高于黄绵马酸 BB 组或红霉素组 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

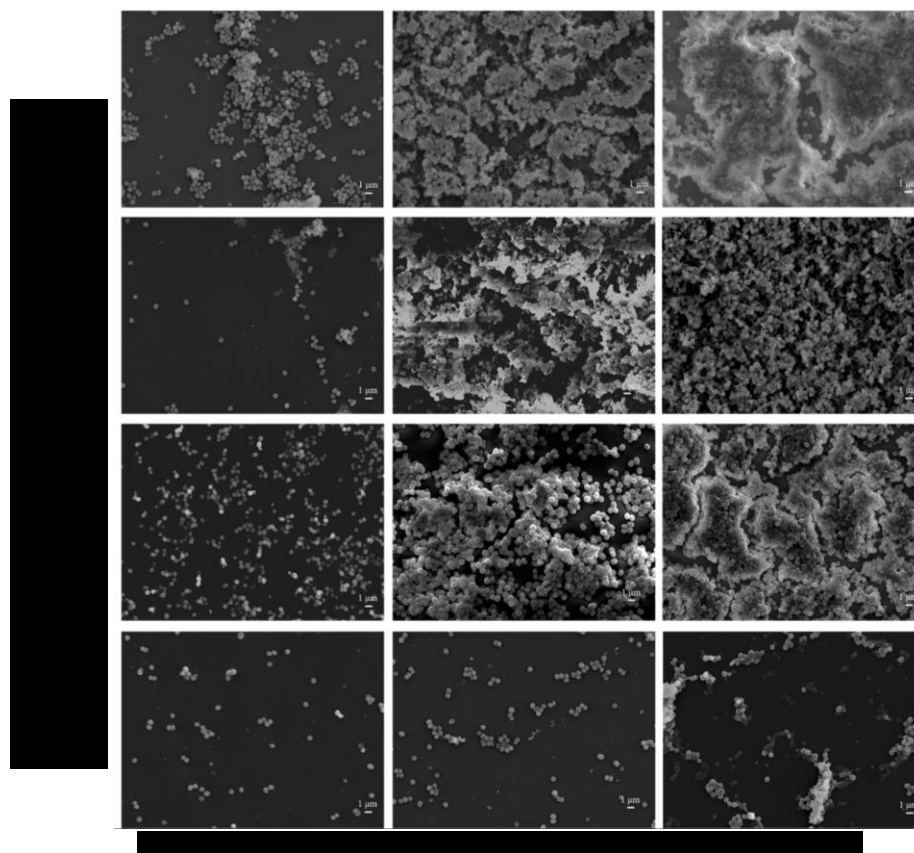
结合图 6 与图 7 发现, SE04 和 SE08 菌株的各给药组在各个阶段均有效抑制 *aap* 表达, 且两株受试菌联合用药组均在黏附期对 *aap* 表达的下调作用显著优于单药组; 对于 SE04 和 SE08 菌株, 黄绵马酸 BB 在生物被膜形成聚集期对 *agrA* 均表现明显

的上调作用。联合用药组对 SE04 菌株生物被膜形成各阶段 *agrA* 表达均呈显著上调作用, 对 SE08 菌株仅表现在黏附阶段; 联合用药组对 SE08 菌株生物被膜形成各阶段 *sarA* 的表达均呈显著抑制作用, 对 SE04 菌株仅表现在黏附期。总而言之, 说明联合用药对耐药和敏感受试菌 *aap* 基因的调节作用规律基本一致, 且对耐药菌株 SE04 的 *agrA* 调控作用相较敏感菌株 SE08 更持久, 而对 SE08 菌株的 *sarA* 调控作用较 SE04 菌株更持久。

4 讨论

已有研究发现, 红霉素作为临床治疗常用抗生素, 其在亚抑菌浓度条件下可诱导耐药表皮葡萄球菌产生生物被膜, 从而增强细菌的耐药性^[16]。因此, 如何有效防止生物被膜的形成仍然是一个具有挑战性的问题。

细菌生物被膜是一个由多种物质组成的复杂有机体, 在生物被膜形成的过程中, 存在多种基因表



BB-20 $\mu\text{g/mL}$ 黄绵马酸 BB ERY-0.04 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素 BB + ERY-20 $\mu\text{g/mL}$ 黄绵马酸 BB + 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素
BB-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ flavaspidic acid BB ERY-0.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ erythromycin BB + ERY-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ flavaspidic acid BB + 0.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ erythromycin

图 5 SEM 观察黄绵马酸 BB 联合红霉素对表皮葡萄球菌 SE08 生物被膜不同阶段微观结构的影响 ($\times 3000$)

Fig. 5 Effect of flavaspidic acid BB combined with erythromycin on microstructure of *Staphylococcus epidermidis* SE08 at different stages of biofilm formation by SEM ($\times 3000$)

达相互调控,甚至受到群体感应系统的影响。研究表明,在细菌聚集形成微菌落时,发挥主要作用的是多糖胞间黏附素 (polysaccharide intercellular adhesion, PIA),由 *ica* 操纵子介导。同时 *sarA* 是 *ica* 操纵子的转录激活子,其可以控制 *ica* 的表达影响 PIA 的形成,分泌胞外聚合物 (extracellular polymeric substance, EPS) 包裹细菌,从而控制生物被膜的形成^[17]。此外,在细菌增殖及聚集的过程中,还存在着非 PIA 依赖形成生物被膜的途径。表皮葡萄球菌表面的相关聚集蛋白 Aap 是非 PIA 依赖途径的关键,是表皮葡萄球菌细胞壁上的蛋白黏附分子,由基因 *aap* 编码产生,可通过 Zn 依赖型机制介导细胞间相互黏附聚集,进而促进表皮葡萄球菌生物被膜的形成^[18];生物被膜到达成熟阶段后,群体感应系统被激活来调控生物被膜的进一步形成以及脱落。群体感应系统通过监测其群体密度来调节特定的基因表达,为菌体生长以及生物膜形成提供

保障,还可以调控 EPS 的合成,介导细菌的黏附能力,影响生物膜的成熟与结构^[19]。迄今为止,葡萄球菌属中主要被报道的群体感应系统有 *agr* 系统和 LuxS 系统。*agrA* 为 *agr* 群体感应系统的反应调节剂,可激活系统的表达并调控 RNAPIII 的表达和 *psmA/psm β* 编码 phenol-soluble modulins (PSMs),从而进一步调控生物被膜的形成。有研究表明, *agr* 系统还能促进生物膜脱落及解离,并可以上调细菌蛋白酶和毒素,下调黏附素等^[20]。结合本研究结果,说明黄绵马酸 BB 联合红霉素是通过抑制 *aap* 和 *sarA* 基因的表达,减少 PIA 生成和细菌相互聚集黏附。同时,通过上调群体感应相关基因 *agrA* 的表达,从而抑制生物被膜的形成。

抗生素耐药菌株的出现一直是临床用药的一大难点。本研究通过 XTT 实验、半定量黏附实验结果发现,黄绵马酸 BB 与红霉素联合用药后耐药菌株生物被膜的各阶段代谢水平及生物被膜形成总量均显

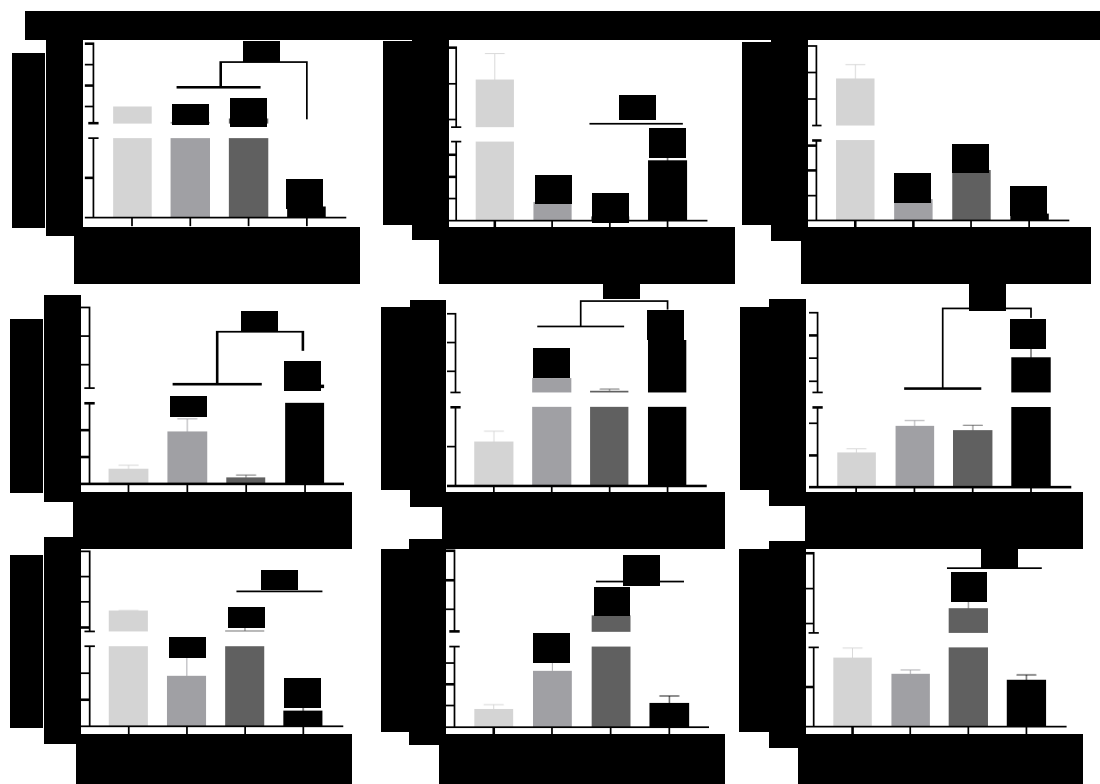


图 6 黄绵马酸 BB 联合红霉素对 SE04 生物被膜形成各阶段相关基因的相对表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Relative expression of relevant genes in various stages of SE04 biofilm formation treated flavaspidic acid BB combined with erythromycin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

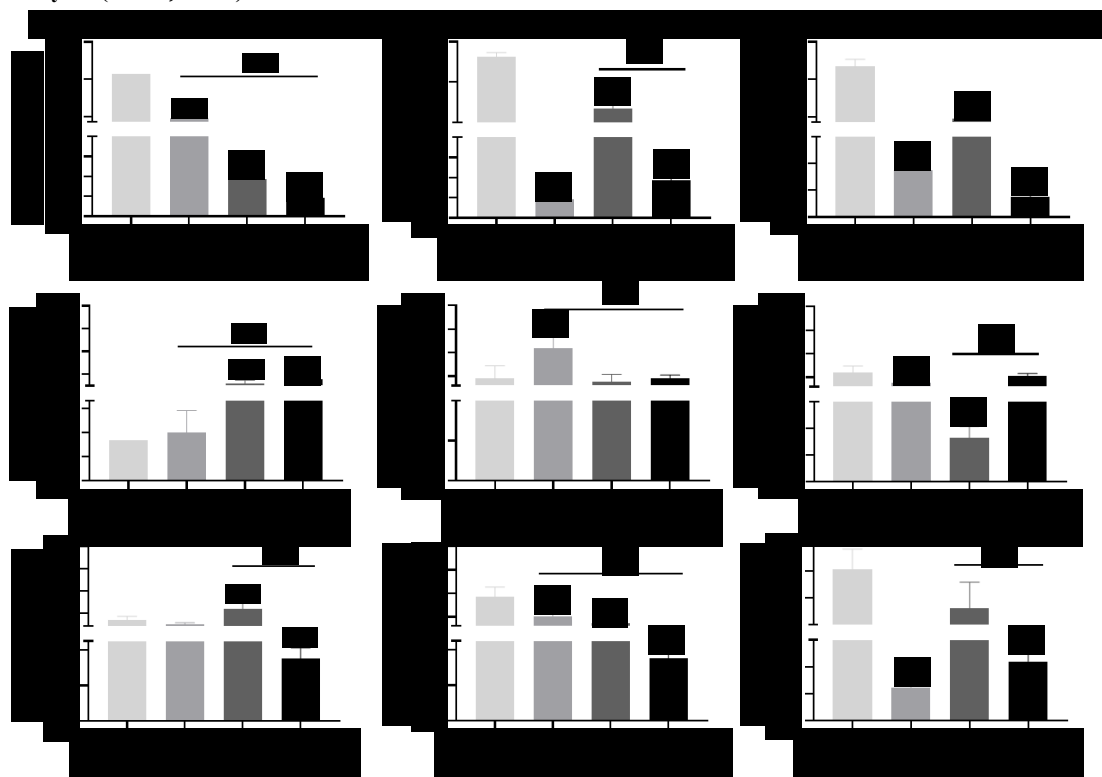


图 7 黄绵马酸 BB 联合红霉素对 SE08 生物被膜形成各阶段相关基因的相对表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Relative expression of relevant genes in various stages of SE08 biofilm formation treated flavaspidic acid BB combined with erythromycin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

著降低,且随着生物被膜的逐渐成熟,其抑制效果逐渐减弱。结合 SEM 观察结果分析,导致这一结果的原因可能是由于成熟的生物被膜具有较紧密的三维结构,并且 EPS 为膜内细菌形成了一层扩散屏障,防止抗生素等有毒物质扩散至菌体内,因此更能耐受药物处理。同时,由 SEM 观察结果分析可得联合用药可有效降低细菌量、减少细菌之间的黏连及 EPS 的形成。此外,qRT-PCR 实验结果表明,联合用药对耐药菌株的 *aap*、*agrA* 和 *sarA* 基因的表达均具明显调控作用。综上推断,黄绵马酸 BB 与红霉素联合用药对耐药表皮葡萄球菌生物被膜的作用机制可能是在生物被膜形成初期抑制细菌代谢活性,导致细菌活力降低,难以在表面进行黏附;在细菌聚集形成微菌落时,抑制 PIA 的生成,导致 EPS 的分泌量减少,减少细菌间的相互聚集和黏附,从而抑制生物被膜的形成;当微菌落逐渐扩大,生物被膜不断增厚到达成熟阶段后,药物较难穿透生物被膜作用于内部菌体,但仍可通过调控群体感应系统来促进生物膜的脱落及解离,从而达到清除生物被膜的作用。

综上所述,黄绵马酸 BB 联合红霉素可以干扰表皮葡萄球菌生物被膜的形成,有效降低细菌对其抗生素的耐药性,达到减量增效的效果,为将黄绵马酸 BB 开发成为一种新型的生物被膜抑制剂提供了理论基础,也为抗菌药物的开发利用提供了更多的可能性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tognetti L, Martinelli C, Berti S, *et al.* Bacterial skin and soft tissue infections: Review of the epidemiology, microbiology, aetiopathogenesis and treatment: A collaboration between dermatologists and infectivologists [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2012, 26(8): 931-941.
- [2] 李晓雨, 马明葱, 谭云芳, 等. 广东省 2016 年细菌耐药性监测及动态分析 [J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(10): 1263-1270.
- [3] Beenken K E, Dunman P M, McAleese F, *et al.* Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(14): 4665-4684.
- [4] Ehrlich G D, Ahmed A, Earl J, *et al.* The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution *in situ* during chronic bacterial biofilm infectious processes [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010, 59(3): 269-279.
- [5] Chen Y, Liu T J, Wang K, *et al.* Baicalein inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the quorum sensing system *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153468.
- [6] Peng B, Bai R F, Li P, *et al.* Two new glycosides from *Dryopteris fragrans* with anti-inflammatory activities [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18(1): 59-64.
- [7] 殷川平, 陈文浩, 莫梓童, 等. 黄绵马酸 BB 对皮肤软组织感染致病菌的抗菌活性及机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1662-1667.
- [8] Wayne P A, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. [S]. 11th ed. CLSI standard M07. 2018.
- [9] Ko S J, Kang N H, Kim M K, *et al.* Antibacterial and anti-biofilm activity, and mechanism of action of pleurocidin against drug resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Microb Pathog*, 2019, 127: 70-78.
- [10] Manalo R V M, Josol V J D, Gloriani N G. The differential effects of atorvastatin co-administered with ampicillin on the bacterial growth and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* [J]. *Curr Med Res Pract*, 2017, 7(5): 178-183.
- [11] 马冬梅, 陶庆春, 齐宏伟. 双黄连粉针剂联合三种抗生素对广泛耐药鲍曼不动杆菌的体外抑菌分析 [J]. *中国临床研究*, 2017, 30(12): 1702-1703.
- [12] 陈学情, 蒋家璇, 任志鸿, 等. 纳米银的抗菌特性及对多重耐药菌株的抗菌作用 [J]. *微生物学报*, 2017, 57(4): 539-549.
- [13] 姜剑伟, 陈向东, 汪辉, 等. 莫西沙星对耐药葡萄球菌生物膜体外药效学研究 [J]. *药学与临床研究*, 2015, 23(4): 347-350.
- [14] Schneider R, Primon-Barros M, von Borowski R G, *et al.* Pseudonajide peptide derived from snake venom alters cell envelope integrity interfering on biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* [J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 237.
- [15] Luther M K, Arvanitis M, Mylonakis E, *et al.* Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an *in vitro* pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an *in vivo* survival assay using *Galleria mellonella* larvae [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8): 4612-4620.
- [16] 何洪静. 表皮葡萄球菌耐药特征及其 PIA 上游调控子与亚-MIC 红霉素影响其生物膜形成的关系研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- [17] Tormo M A, Martí M, Valle J, *et al.* SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(7): 2348-2356.
- [18] Conrady D G, Wilson J J, Herr A B. Structural basis for Zn²⁺-dependent intercellular adhesion in staphylococcal biofilms [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(3): E202-E211.
- [19] 舒琴, 牛永武, 陈启和. 细菌生物被膜中群体感应调控机制及其控制研究展望 [J]. *生物加工过程*, 2019, 17(3): 292-299.
- [20] Le K Y, Michael O. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview [J]. *Frontiers Microbiol*, 2015, 6: 1174-1182.

[责任编辑 潘明佳]