

黄芩素对肺炎克雷伯菌生长及生物膜形成能力影响的研究

温绍霞^{1,2}, 武军驻^{1△} (1. 武汉大学基础医学院, 湖北武汉 430071; 2. 湖北省十堰市西苑医院 442000)

【摘要】 目的 研究黄芩素对肺炎克雷伯菌体外生长及生物膜形成能力的影响。**方法** 以临床分离的多重耐药肺炎克雷伯菌为试验菌株, 肉汤二倍稀释法检测黄芩素对肺炎克雷伯菌的最低抑菌浓度(MIC)。同时检测黄芩素对肺炎克雷伯菌体外生长、生物膜形成能力的影响。**结果** 肉汤二倍稀释法检测黄芩素对肺炎克雷伯菌的最低抑菌浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$, 在 30 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下肺炎克雷伯菌的生长速度明显降低, 生物膜形成能力减弱。**结论** 黄芩素可通过抑制肺炎克雷伯菌体外生长、生物膜形成而抑制其生长。

【关键词】 黄芩素; 多重耐药肺炎克雷伯菌; 生长; 生物膜

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.20.036 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)20-2707-02

近年来由于抗菌药物的不合理使用, 肺炎克雷伯菌已对多种抗菌药物产生不同程度的耐药性, 且呈多耐药趋势^[1]。生物被膜是肺炎克雷伯菌产生耐药的重要机制^[2]。初步试验证明, 黄芩对多重耐药肺炎克雷伯菌具有良好的抗菌效果。黄芩素是黄芩提取物中的一种主要成分, 因而作者以黄芩素为研究对象, 了解黄芩素对多重耐药肺炎克雷伯菌生物膜及荚膜形成的影响, 为临床上联合黄芩素进行耐药肺炎克雷伯菌的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 分离于湖北医药学院附属医院患者痰液, 为一株耐亚胺培南肺炎克雷伯菌。

1.1.2 主要试剂 黄芩素购自上海源叶生物有限公司, 以二甲亚砜溶液(DMSO)溶解为 1 mg/mL 储备液。

1.1.3 仪器 菌株鉴定及药敏试验均由 VITEK-32 全自动微生物鉴定系统进行鉴定。

1.2 方法

1.2.1 MIC 测定 采用肉汤二倍稀释法检测黄芩素对耐亚胺培南肺炎克雷伯菌的 MIC。

1.2.2 黄芩素对耐药肺炎克雷伯菌生长曲线的影响 首先将耐亚胺培南肺炎克雷伯菌接种于 LB 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后, 转接至加入终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩素或加入 DMSO(作为空白对照, 避免 DMSO 对细菌生长的影响)的新鲜 LB 培养液, 使菌液初浓度在 $A_{620}=0.05$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 200 r/min 进行培养, 每 1 小时取 100 μL 检测 A_{620} 值, 直至细菌进入平台期。

1.2.3 黄芩素对肺炎克雷伯菌生物膜形成的影响 将过夜培养肺炎克雷伯菌菌液 50 倍稀释转接于 15 mL 的 LB 肉汤(50 mL 三角瓶)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 200 r/min 培养至 $A_{600}=1.0\sim1.2$ 。用 LB 肉汤稀释至 $A_{600}=1.0$ 而分装至小试管(细胞培养专用)中, 每管 2 mL。分别加入终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩素或加入 DMSO, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养 48 h 后吸去菌液, 将带有生物膜的试管用去离子水润洗 3 次, 洗去游离菌体。放置 15 min 后加入 3 mL 的 0.1% 结晶紫溶液染色 30 min。弃去染色液后用 3 mL 的去离子水润洗 5 次, 充分洗去游离的结晶紫。将管壁内的残余水珠擦干, 拍照后每孔加入 2 mL 的 95% 乙醇, 放置 1~2 h, 间隔摇晃, 溶解结晶紫。取溶解的结晶紫溶液测定 A_{570} 的值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIC 的检测结果 黄芩素对耐亚胺培南肺炎克雷伯菌的 MIC 结果为 60 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 黄芩素对耐药肺炎克雷伯菌生长曲线的影响 在终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时, 黄芩素明显降低肺炎克雷伯菌体外生长速度, 加入黄芩素 4 h 后细菌生长量较对照组减少 1 倍(图 1)。

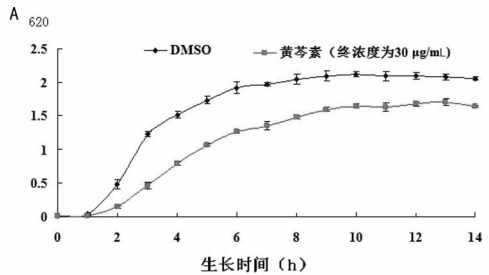
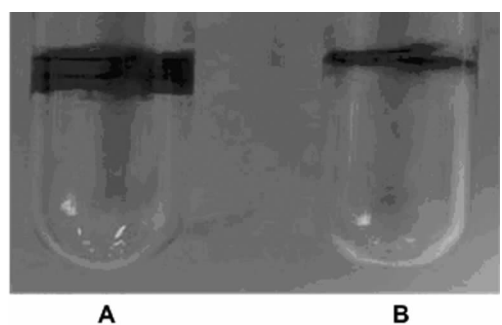


图 1 黄芩素对肺炎克雷伯菌生长曲线的影响

2.3 黄芩素对肺炎克雷伯菌生物膜形成的影响 黄芩素减弱肺炎克雷伯菌生物膜形成能力, 在加入黄芩素静止培养 48 h 后, 细菌在试管壁形成生物膜的厚度明显较对照组薄, 见图 2。定量检测对照组溶解结晶紫 A_{570} 为 1.09 ± 0.05 , 而加入黄芩素组为 0.67 ± 0.03 , 差异有统计学意义($P<0.01$)。



注: A 未加入黄芩素; B 加入终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩素。

图 2 黄芩素对肺炎克雷伯菌生物膜形成能力的影响(定性检测)

3 讨论

肺炎克雷伯菌是临床常见的一类生物膜致病菌。细菌生物膜是细菌在生长过程中为适应生存环境而吸附于惰性或活性材料表面后, 分泌多糖基质、纤维蛋白、脂蛋白等复合物, 使不同细菌相互粘连, 缠绕并聚集在上述多糖复合物内而形成的

膜样物,是细菌适应自然环境而持有的生存方式。据施德仕等^[3]报道越来越多的生物膜感染被发现,许多难以治疗的感染都可以追溯到生物膜之上。细菌生物膜是多种感染的重要特点,细菌生物膜形成后耐药性明显增加^[4-5]。据王方英等^[6]报道细菌生物膜能影响 TLR2 表达水平,继而影响机体免疫系统来达到保护自身的目的。生物膜的存在引起的巨大挑战是其显著地抑制宿主自身防御系统和抗生素的清除^[7]。

黄芩素化学名为 5,6,7-羟基黄酮,是唇形科植物黄芩干燥根重要有效成分之一。黄芩具有广泛的药理作用,在临床主要用于抗菌消炎和抗感染^[8]。本课题组前期研究已初步证明黄芩素在体外能抑制多重耐药肺炎克雷伯菌的生长。在此基础上深入研究黄芩素对肺炎克雷伯菌的抗菌作用,确定黄芩素对多重耐药肺炎克雷伯菌的抑菌浓度,探讨黄芩素对肺炎克雷伯菌生物膜的干预作用。研究结果表明在加入终浓度为 30 μg/mL 黄芩素后,细菌生长速度明显减慢;并且加入黄芩素后培养肺炎克雷伯菌形成能力下降,考虑可能是当加入黄芩素后,黄芩素可以通过减少肺炎克雷伯菌对载体的吸附,抑制和清除肺炎克雷伯菌生物膜。

综上所述,黄芩素可影响多重耐药肺炎克雷伯菌的生长及生物膜的形成。在此基础上本课题组将对黄芩素影响生物膜形成的作用机制做进一步的研究。这将为我国利用丰富中草药,解决日趋严重的细菌耐药性问题奠定基础。

参考文献

[1] 马建新,徐燕,杨林. 多药耐药肺炎克雷伯菌抗菌制剂外

排泵基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(19): 3971-3974.
[2] 周蓉,朱卫民. 肺炎克雷伯菌分子流行病学及耐药机制研究进展[J]. 国外医药:抗生素分册,2012,33(1):1-5.
[3] 施德仕,邵海枫. 细菌生物膜感染的研究进展[J]. 医学研究学报,2011,24(12):1319-1323.
[4] Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms; an emerging Link to disease pathogenesis[J]. Annu Rev Microbiol, 2003,57:677-701.
[5] 范维珂,冉隆华. 与生物膜作斗争[J]. 科学,2001,57(10):57-63.
[6] 王方英,陈维贤. 肺炎克雷伯菌生物膜面对单核细胞株受体表达的影响[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(6):493-496.
[7] Lauderdale KJ,Boles BR,Cheung AL,et al. Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in Staphylococcus aureus biofilm maturation[J]. Infect Immun,2009,77(4):1623-1635.
[8] Hall-Stoodley L,Costerton JW,Stoodley P. Bacterial biofilms;from the natural environment to infectious diseases [J]. Nat Rev Microbiol,2004,2(2):95-108.

(收稿日期:2013-03-13 修回日期:2013-06-12)

• 临床研究 •

幽门螺杆菌的家庭聚集性

高春艳(山西大医院/山西医学科学院检验科,太原 030040)

【摘要】 目的 调查幽门螺杆菌的家庭聚集现象。**方法** 以 152 例幽门螺杆菌感染确诊者为索引,对其家庭成员进行粪便幽门螺杆菌抗原检测,共 507 例受检者(不包括 152 例确诊者),作为实验组。同时随机抽取 510 例来该院体检者作为对照组,进行粪便幽门螺杆菌检测,然后对数据进行统计分析。**结果** 507 例受检者共检出 451 例阳性,总的阳性率为 88.95%。对照组共检出 249 例阳性,总阳性率为 48.82%。**结论** 幽门螺杆菌感染有家庭聚集现象,当家庭成员之一存在幽门螺杆菌感染时,其他成员应及时检测,以免延误治疗。

【关键词】 幽门螺杆菌; 家庭成员; 聚集性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.20.037 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)20-2708-02

幽门螺杆菌(Hp)感染是较常见的慢性细菌感染,全世界约 50% 的人胃黏膜上有 Hp 存在并繁殖。据调查,30%~80% 的中国人存在 Hp 感染,母亲咀嚼食物喂养婴幼儿、全家共碗是我国幽门螺杆菌感染的主要原因^[1]。相关研究表明,Hp 感染存在明显的家庭聚集现象,但大多数已开展的研究主要是针对有症状儿童的父母和兄弟姐妹,而不是普通人群^[2]。为了避免这种可能出现的选择偏差,作者以 152 例幽门螺杆菌感染确诊者为索引,对其家庭成员进行粪便幽门螺杆菌抗原检测,共 507 例受检者(不包括 152 例确诊者)作为实验组。同时随机抽取 510 例来本院体检者作为对照组,对其进行粪便幽门螺杆菌检测,探讨 Hp 的家庭聚集现象。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 11 月至 2012 年 11 月在本院通过¹³C 尿素呼气试验以及取胃窦小弯黏膜做快速尿素酶试验确

诊的 Hp 感染者,以其为索引,以其家庭成员为研究对象作为实验组,共 507 例受检者,年龄 1~84 岁,其中男 255 例,女 252 例。另随机抽取 510 例来本院体检者作为对照组,身体均健康,无各种急慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌或相关病史,年龄 2~83 岁,其中男 257 例,女 253 例。分别对其进行粪便 Hp 抗原检测。

1.2 方法 嘱受检者于清晨取适量粪便标本储存于干净且不吸水并带盖的容器中,取样后立即用塞提斯 Hp 抗原检测条(免疫层析法)进行检测,以只在质控区显示一条绿色线(质控线)判断为阴性,以质控区显示一条绿色线,结果区显示一条红色线(结果线)判断为阳性。若未显示质控线(绿线)而无论有无明显结果线(红线)均视为无效结果,需重新检测。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.5 软件,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。