

ing levels of endothelin-1 (ET-1) and its precursor (Big ET-1) in breast cancer early diagnosis[J]. Tumour Biol, 2012,33(4):1231-1236.

[11] Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, et al. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion[J]. Cancer Res, 2004, 64(7): 241-2468.

[12] 苗瑞政, 吴泰璜, 刘乃青, 等. 乳腺癌手术前后血浆内皮素-1 的变化和临床意义[J]. 中国现代普外科进展, 2005, 8(6): 375-376.

[13] Alanen K, Deng DX, Chakrabarti S. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma[J]. Histopathology, 2000, 36(2): 161-167.

[14] Naushad SM, Hussain T, Alattas OS, et al. Molecular in-

• 临床探讨 •

sights into the association of obesity with breast cancer risk: relevance to xenobiotic metabolism and CpG island methylation of tumor suppressor genes[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 392(1/2): 273-280.

[15] Dadmehr M, Hosseini M, Hosseonkhani S, et al. DNA methylation detection by a novel fluorimetric nanobiosensor for early cancer diagnosis[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 15(60): 35-44.

[16] Mitaka C, Hirata Y, Ichikawa K, et al. Effects of TNF- $\alpha$  on hemodynamic changes and circulating EDNthelium-derived vasoactive factors in dogs[J]. Am J Physiol 1994, 267(4): 1530-1536.

(收稿日期: 2016-01-15 修回日期: 2016-03-28)

# 鱼腥草素钠联合聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜的作用<sup>\*</sup>

张家超, 查长森, 欧 翊  
(广东省佛山市南海区第七人民医院 528247)

**摘 要:**目的 探讨鱼腥草素钠联合聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜的作用。方法 采用微量稀释法测定聚维酮碘、鱼腥草素钠及两药联用对铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度(MIC), 棋盘稀释法测定聚维酮碘、鱼腥草素钠及两药联用对铜绿假单胞菌生物被膜的最小抑膜浓度(SMIC)。结果 聚维酮碘对铜绿假单胞菌的 MIC 为 256  $\mu\text{g/mL}$ , 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌的 MIC 为 512  $\mu\text{g/mL}$ , 两药联合使用时, 聚维酮碘 MIC 为 64  $\mu\text{g/mL}$ , 鱼腥草素钠 MIC 为 64  $\mu\text{g/mL}$ ; 分级抑菌浓度指数(FIC)为 0.285。在黏附期、早期生物膜期、成熟生物膜期(培养 1、3、7 d), 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜 SMIC<sub>50</sub> 为 128、128 和 56  $\mu\text{g/mL}$ , SMIC<sub>80</sub> 分别为 512、512 和 512  $\mu\text{g/mL}$ ; 聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜 SMIC<sub>50</sub> 为 128、256 和 256  $\mu\text{g/mL}$ , SMIC<sub>80</sub> 分别为 256、512 和 512  $\mu\text{g/mL}$ , 两药联合使用时聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜 SMIC<sub>50</sub> 为 64、128 和 128  $\mu\text{g/mL}$ , SMIC<sub>80</sub> 分别为 128、256 和 256  $\mu\text{g/mL}$ 。结论 鱼腥草素钠对聚维酮碘的抑菌效果具有协同作用, 且能够增强聚维酮碘对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制作用。

**关键词:**鱼腥草素钠; 聚维酮碘; 铜绿假单胞菌; 生物被膜

**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.033 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)14-1993-03

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

菌株: 铜绿假单胞菌(ATCC 27853)由本院细菌室提供。培养基: LB 细菌培养基(Sigma), 营养琼脂(北京陆桥技术公司)。药物: 鱼腥草素钠(中国药品生物制品鉴定所), 聚维酮碘消毒液(利尔康), 胰酶大豆肉汤, 米勒-海顿(MH)肉汤。硅胶片、96 孔板、24 孔板等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 测定聚维酮碘、鱼腥草素钠对 PAE 的最小抑菌浓度(MIC)

将新鲜培养的 PAE 用胰酶大豆肉汤配制成  $1.5 \times 10^8$  CFU 浓度菌液。聚维酮碘溶液和鱼腥草素钠分别用 MH 培养基对倍稀释成 10 个浓度梯度: 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1  $\mu\text{g/mL}$ , 分别加入 96 孔板中, 每个浓度 8 个复孔, 每孔的体积为 100  $\mu\text{L}$ 。另设一列不含药物的培养基作为正常对照组, 菌液以比浊法调整到 0.5 麦氏浓度, 经 200 倍稀释后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$ , 振荡, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后涂布血琼脂平板, 以无菌生长的最小稀释浓度为 MIC。

#### 1.2.2 测定鱼腥草素钠、聚维酮碘溶液协同对 PAE 的 MIC

采用棋盘稀释法进行协同抗菌实验, 鱼腥草素钠、聚维酮碘溶

<sup>\*</sup> 基金项目: 广东省佛山市科学技术局文件(2014AB000482)。

液分别用 MH 培养基稀释 2~1/64MIC 共 8 个浓度梯度,分别加入 96 孔板中,每个浓度 8 个复孔,每孔的体积为 100  $\mu$ L。菌液以比浊法调整到 0.5 麦氏浓度,经 200 倍稀释后,每孔加入 100  $\mu$ L,振荡,37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后涂布血琼脂平板,以无菌生长的最小稀释浓度为 MIC。

**1.2.3 测定鱼腥草素钠、聚维酮碘溶液及联合使用对 PAE 生物被膜的最小抑膜浓度(SMIC)** 聚维酮碘溶液和鱼腥草素钠分别用 MH 培养基对倍稀释成 10 个浓度梯度:512、256、128、64、32、16、8、4、2、1  $\mu$ g/mL,加入 96 孔板中,每个浓度 8 个复孔,第 11 列以加菌而不加药物的培养基作为阴性对照,12 列加培养基作为空白对照;1、3、7 d 时间点作为黏附期、早期生物被膜阶段、成熟期生物被膜阶段,37  $^{\circ}$ C 培养每隔 24 h 更换药物培养基,培养 1、3、7 d 采用 MTT 法检测抑制生物被膜 50% (SMIC50)和 80% (SMIC80)的药物浓度;取出酶标板,MTT 法酶标仪 492 nm 波长下读取 OD 值,每个药物浓度梯度复孔取均值,以阴性对照的 OD 值为 100%,各药物组 OD 值为阴性对照的 20%、50%为 SMIC80 和 SMIC50。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计分析数据,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 聚维酮碘溶液、鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌的 MIC** 聚维酮碘对铜绿假单胞菌的 MIC 为 256  $\mu$ g/mL,鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌的 MIC 为 512  $\mu$ g/mL;两药联合使用时,聚维酮碘 MIC 为 64  $\mu$ g/mL,鱼腥草素钠 MIC 64  $\mu$ g/mL;分级抑菌浓度指数(FIC)为 0.285,小于 0.5,说明鱼腥草素钠协同聚维酮碘对铜绿假单胞菌的抑菌作用。

**2.2 鱼腥草素钠、聚维酮碘溶液及联合使用对 PAE 生物被膜的 SMIC** 37  $^{\circ}$ C 培养 1、3、7 d 时,鱼腥草素钠、聚维酮碘溶液以及联合使用对 PAE 生物被膜的 SMIC50 和 SMIC80 的值见表 1、2。

| 表 1 鱼腥草素钠、聚维酮碘溶液及联合使用对 PAE 生物被膜的 SMIC50( $\mu$ g/mL) |      |     |     |
|------------------------------------------------------|------|-----|-----|
| 药物                                                   | 培养时间 |     |     |
|                                                      | 1 d  | 3 d | 7 d |
| 聚维酮碘                                                 | 128  | 256 | 256 |
| 鱼腥草素钠                                                | 128  | 128 | 256 |
| 两药协同(聚维酮碘)                                           | 64   | 128 | 128 |

| 表 2 鱼腥草素钠、聚维酮碘溶液及联合使用对 PAE 生物被膜的 SMIC80( $\mu$ g/mL) |      |     |     |
|------------------------------------------------------|------|-----|-----|
| 药物                                                   | 培养时间 |     |     |
|                                                      | 1 d  | 3 d | 7 d |
| 聚维酮碘                                                 | 256  | 512 | 512 |
| 鱼腥草素钠                                                | 512  | 512 | 512 |
| 两药协同(聚维酮碘)                                           | 128  | 256 | 256 |

## 3 讨 论

PAE 广泛分布于周围环境及正常人的皮肤和上呼吸道,特别是医院病房、治疗台面、床头柜、医疗器械等部位,是院内感染的常见致病菌,主要感染年老体弱、患有慢性疾病或免疫

功能低下的患者,有报道 PAE 所引起的院内感染约占 10%~35%,居病原菌之首<sup>[6]</sup>。PAE 的生物被膜发挥了重要作用,据研究 PAE 的生物被膜是细菌为适应周围不利环境,分泌的多糖基质、纤维蛋白、脂蛋白等将其自身包绕其中形成的膜样物,是细菌群体生长的一种方式,较之于浮游菌,膜内菌对抗生素及杀菌剂耐受力更强<sup>[7-15]</sup>。聚维酮碘是一种性能优秀的新型中效消毒剂,具有低毒、稳定性好、使用方便、无气味且不污染物品等优点,作为医用消毒剂在国内外得到广泛应用;鱼腥草素钠作为天然植物鱼腥草的有效成分之一,对铜绿假单胞菌有一定的抗菌活性,能有效抑制铜绿假单胞菌生物被膜的形成。21 世纪初国内外研究主要集中在 PAE 生物被膜的组成成分和形成机制及基因启动上,近年来,研究中草药在体外对 PAE 生物被膜的形成作用研究成为热点,鱼腥草素钠通过干扰或抑制铜绿假单胞菌生物被膜的形成,消除生物屏蔽,使消毒药物直接作用细菌<sup>[16]</sup>;聚维酮碘是一种中效、低毒的消毒液,在院感防控方面为广大医院所应用<sup>[17-20]</sup>。鉴于 PAE 在医院内感染防控中的作用,研究鱼腥草素钠联合聚维酮碘抑制 PAE 生物被膜的形成,为院内感染防控、医院内环境消杀和临床治疗生物被膜 PAE 的多重耐药性等方面提供依据。

随着病原菌与消毒剂接触次数的增加,其对常用抗生素和消毒剂的耐药性也以不同的速度增长。绒毅等<sup>[21]</sup>研究几种医院感染病原菌抗药基因检测及其对聚维酮碘抗性,结果显示聚维酮碘对 7 株 PAE 的 MIC 值为 500~1 000 mg/L,30 株临床病原菌抗药基因携带率为 43.33%,且携带抗药基因的菌株与其对聚维酮碘的抗力关系不明显。陈杨芳等<sup>[22]</sup>研究聚维酮碘对 PAE 杀菌效果及抗性,结果显示随着菌液传代 B1~B9 代,聚维酮碘 MIC 逐渐升高,提示尽管聚维酮碘对 PAE 具有很强的杀灭效果,然而经聚维酮碘作用后传代的 PAE 可产生一定的抗性。相关研究指出人体细菌感染有 65% 涉及生物被膜,临床上许多难治性感染与此相关<sup>[23]</sup>。PAE 生物被膜在院内感染中占到了 60% 以上,是细菌为适应自然环境、有利于生存而特有的生命现象。以上文献报道提示,抗菌药物的大量使用及生物被膜结构的形成导致 PAE 抗药性的主要因素,单纯使用聚维酮碘杀灭 PAE 效果局限<sup>[24]</sup>。蓝锴等<sup>[25]</sup>研究发现鱼腥草提取物对多重耐药 PAE 有不同程度的抑制作用。程惠娟等<sup>[26]</sup>研究发现鱼腥草素钠对 PAE 早期及成熟期的生物被膜有一定的清除作用。吴大强等<sup>[27]</sup>研究发现鱼腥草素钠可有效抑制 PAE 运动能力,可能与细菌鞭毛和菌毛结构基因 *fagB* 和 *pilG* 的表达下调相关。本研究则联合鱼腥草素钠与聚维酮碘对 PAE 进行抑菌实验、抑膜实验,结果显示聚维酮碘对 PAE 的 MIC 为 256  $\mu$ g/mL,鱼腥草素钠 MIC 为 512  $\mu$ g/mL,两药联合使用时,聚维酮碘 MIC 为 64  $\mu$ g/mL,鱼腥草素钠 MIC 为 64  $\mu$ g/mL,分级抑菌浓度指数(FIC)为 0.285,小于 0.5,说明鱼腥草素钠协同聚维酮碘对 PAE 的抑菌作用。程惠娟等<sup>[28]</sup>研究发现鱼腥草水提液与阿奇霉素抗菌相加作用明显,并能抑制 PAE 生物膜的形成,提示鱼腥草与常规消毒抑菌药物联合使用可能会增强抑菌、杀菌效果,本研究结果也说明了鱼腥草素钠的协同作用与文献报道类似。朱玲玲等<sup>[5]</sup>研究发现鱼腥草素钠能显著增强头孢他啶抗 PAE 及生物被膜形成的效果,两药协同性明显。李鸿雁等<sup>[29]</sup>研究发现鱼腥草与左氧氟沙星具有协同抗 PAE 作用,且对生物被膜细菌具有清除作用。本研究将 37  $^{\circ}$ C 培养 1、3、7 d 分别作为细菌的黏附期、早期生物被膜阶段、成熟生物被膜阶段<sup>[30-31]</sup>,结果显示,鱼腥草素钠对 PAE 生物被膜 SMIC50 为 128、128 和 56  $\mu$ g/mL,SMIC80 分

别为 512、512 和 512  $\mu\text{g/mL}$ ；聚维酮碘对 PAE 生物被膜 SMIC50 为 128、256 和 256  $\mu\text{g/mL}$ ，SMIC80 分别为 256、512 和 512  $\mu\text{g/mL}$ ，两药联合使用时聚维酮碘对 PAE 生物被膜 SMIC50 为 64、128 和 128  $\mu\text{g/mL}$ ，SMIC80 分别为 128、256 和 256  $\mu\text{g/mL}$ ，说明鱼腥草素钠及聚维酮碘对 PAE 生物被膜均有抑制作用，且鱼腥草素钠能够增加聚维酮碘的抑膜作用，两药协同性显著，与以上文献报道结果类似。

本研究结果显示聚维酮碘联合鱼腥草素钠联合用药时，鱼腥草素钠能够明显增强聚维酮碘对 PAE 的抗菌及抑制 PAE 生物被膜形成的作用，两药具有协同抗 PAE 的效果。因此，医院院感防治方面采用聚维酮碘联合鱼腥草素钠联合用药，效果明显优于聚维酮碘单独用药，对解决院内感染有重要意义。尽管鱼腥草素钠对聚维酮碘的抑菌作用具有协同效果，然而两药是如何协同抑制 PAE 生物被膜形成，相关基因、蛋白表达是否出现变化还未知，因此有待对其协同抑膜机制进行深入研究。

### 参考文献

[1] 巴剑波,刘玉明,殷明,等.聚维酮碘特性及其制剂研究进展[J].中国消毒学杂志,2010,27(1):67-69.

[2] 彭敬红,侯彦强,郑蓉,等.铜绿假单胞菌耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2015,25(8):1696-1698.

[3] 刘立军,孙景春,陈耐新.铜绿假单胞菌院内感染的特点及耐药性的研究分析[J].中国实验诊断学,2012,16(8):1494-1495.

[4] 李嵩文,谭俊青,王康椿,等.5 种中药颗粒剂与水煎剂对 5 种耐药菌株的体外抑菌作用比较[J].检验医学,2015,30(6):567-570.

[5] 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.

[6] 辛续丽,杨朵,王松雪,等.铜绿假单胞菌院内感染分布及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(1):99-101.

[7] 郭小慧,张莉萍.铜绿假单胞菌耐药机制的最新研究进展[J].国际检验医学杂志,2011,32(9):968-971.

[8] 龚映,傅跃先.多重耐药铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J].儿科科学杂志,2015,21(8):58-61.

[9] 张妍,张立.铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药的耐药机制研究进展[J].国际检验医学杂志,2015,36(17):2548-2550.

[10] 宁唤唤,李晶,王严,等.铜绿假单胞菌耐药性与致病性共选择机制研究进展[J].中国抗生素杂志,2015,40(5):382-388.

[11] 姜晓冰,于涛,王青霞.临床分离铜绿假单胞菌质粒介导的喹诺酮耐药机制研究[J].中国抗生素杂志,2015,40(1):61-65.

[12] 杨莹,常艳敏.铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展[J].中国城乡企业卫生,2014,6:32-33.

[13] 许时菲,季萍.铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展[J].内

蒙古中医药,2014,33(4):119-120.

[14] 刘慧慧,李玖军.铜绿假单胞菌耐药机制及耐药性变迁研究进展[J].中国小儿急救医学,2014,21(3):171-173.

[15] 朱明轮,王晓青,邢秀伟.铜绿假单胞菌耐药机制研究进展分析[J].医药与保健,2014,22(2):178.

[16] 刘彬,陈逸杰,程惠娟,等.鱼腥草素钠增强妥布霉素抗铜绿假单胞菌生物被膜作用及抗菌协同作用[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(11):47-50.

[17] 王俊.聚维酮碘在手术室的应用与研究进展[J].现代医学,2013,41(1):63.

[18] 殷雪群,韩小云.聚维酮碘溶液在外科手术腹腔冲洗中应用的研究进展[J].护理研究,2015,29(1):5-8.

[19] 巴剑波,刘玉明,殷明,等.聚维酮碘特性及其制剂研究进展[J].中国消毒学杂志,2010,27(1):67-69.

[20] 赵书理,梁丽梅,林巍.聚维酮碘在围手术期的应用及研究进展[J].吉林医学,2014,35(29):6576-6578.

[21] 戎毅,吴晓松,徐燕,等.几种医院感染病原菌抗药基因检测及其对聚维酮碘抗性研究[J].中国消毒学杂志,2008,25(5):491-493.

[22] 陈杨芳,邹珂.聚维酮碘对铜绿假单胞菌杀菌效果及抗性的观察[J].全科医学临床与教育,2009,7(4):350-352.

[23] 栾耀芳,王冠,王婧男,等.多耐药铜绿假单胞菌抗药基因检测及对常用消毒剂的抗性分析[J].检验医学与临床,2014,11(16):2207-2209.

[24] 汪长中,程惠娟.药物协同抗生物膜研究进展[J].药学学报,2012,47(3):339-345.

[25] 蓝锴,梁文君,张伟铮,等.三种中药对多重耐药铜绿假单胞菌抑菌作用研究[J].现代医药卫生,2014,30(18):2728-2729.

[26] 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):3297-3300.

[27] 吴大强,黄卫锋,段强军,等.鱼腥草素钠抑制铜绿假单胞菌致病相关运动能力的研究[J].中国中药杂志,2015,40(8):1585-1588.

[28] 程惠娟,汪长中,汪海波,等.鱼腥草水提液对铜绿假单胞菌生物被膜的影响及与阿奇霉素的抗菌协同作用[J].时珍国医国药,2012,23(7):1600-1602.

[29] 李鸿雁,夏前明,李福祥,等.鱼腥草与左氧氟沙星联合应用对生物被膜细菌的清除作用[J].中药新药与临床药理,2005,16(1):23-26.

[30] 刘彬,陈逸杰,程惠娟,等.鱼腥草素钠增强妥布霉素抗铜绿假单胞菌生物被膜作用及抗菌协同作用[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(11):47-50.

[31] 陈婧,方建国,吴方建,等.鱼腥草抗炎药理作用机制的研究进展[J].中草药,2014,45(2):284-289.