

# 解毒化瘀方对金黄色葡萄球菌黏附及生物膜形成的影响

张少娥<sup>1</sup> 王啸<sup>1</sup> 谭红略<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:观察解毒化瘀方对钛表面金黄色葡萄球菌黏附及生物膜形成的抑制效用。方法:以耐药金黄色葡萄球菌 ATCC43300 为研究对象,以解毒化瘀方 TSB(Tryptic Soy Broth)不同稀释浓度或与细菌孵育不同时间作为观察组(TSB-J 组)分组依据,以单纯 TSB 培养基(TSB 组)及含庆大霉素 TSB(TSB-G 组)与细菌孵育作为对照组。通过结晶紫染色、细菌超声震荡涂板计数、激光共聚焦显微镜(CLSM)及扫描电镜(SEM)等,观察不同处理因素对钛表面细菌黏附及生物膜形成的抑制效果及特点。结果:无论是定量还是定性分析,相对于 TSB 及 TSB-G 对照组,解毒化瘀方处理组可明显抑制钛表面 ATCC43300 菌株的黏附及生物膜形成,且存在随着解毒化瘀方浓度或孵育时间的增加,其抑制效果更明显的趋势。结论:解毒化瘀方可抑制葡萄球菌,尤其是耐药菌在钛表面的黏附及生物膜的形成,其效用与解毒化瘀方浓度或孵育时间存在依赖关系。

**[关键词]** 解毒化瘀方;金黄色葡萄球菌;黏附;细菌生物膜

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)08-0008-05

## Inhibitory Effect of Jiedu Huayu Decoction on the Adhesion and Biofilm Formation of Staphylococcus Aureus

ZHANG Shaoe<sup>1</sup> WANG Xiao<sup>1</sup> TAN Honglue<sup>1△</sup>

<sup>1</sup> Henan Orthopedic Institute, Henan Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital(Henan Orthopedic Hospital), Luoyang 471000, Henan China.

**Abstract Objective:** To investigate the inhibitory effect of jiedu huayu decoction on the adhesion and biofilm formation of staphylococcus aureus on the titanium surface. **Methods:** Multidrug-resistant Staphylococcus aureus ATCC43300 were used in this study. The different dilution concentration of Jiedu Huayu decoction(J) with TSB(Tryptic Soy Broth) or incubation time of Jiedu Huayu decoction with bacteria were used as the grouping basis for experimental group(TSB-J group). The pure TSB culture medium(TSB group) and TSB containing gentamicin(TSB-G group) incubating with bacteria were designed as the control groups. The inhibitory effect and characteristics of different treatment process on bacterial adhesion and biofilm formation on the titanium surface were observed using crystal violet staining, bacterial ultrasonic plus the spread plate method, CLSM(Confocal Laser Scanning microscopy) and SEM(Scanning Electron Microscopy). **Results:** In both quantitative or qualitative analysis, as compared with TSB and TSB-G group, Jiedu Huayu groups could significantly inhibited the adhesion and biofilm formation of ATCC43300 on the titanium surface. Moreover, with the increase of concentration or incubation time of Jiedu Huayu decoction, the inhibition effect became more obvious. **Conclusion:** Jiedu Huayu decoction can inhibit the adhesion and biofilm formation of drug-resistant bacteria on the titanium surface, its effect is dependent on the concentration or incubation time of Jiedu Huayu decoction.

**Keywords:** Jiedu Huayu decoction; multidrug-resistant staphylococcus aureus; adhesion; bacterial biofilm

基金项目: NSFC-河南联合基金(U1804189)

河南省科技攻关项目(162102310369)

<sup>1</sup> 河南省正骨研究院, 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)  
(河南 洛阳, 471000)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: hnlc\_love@163.com

感染是骨科术后常见并发症,可导致骨折不愈合、肢体功能丧失甚至截肢等<sup>[1]</sup>。目前,治疗与内植物相关的骨关节感染仍极具挑战性,其与细菌生物膜的形成(Bacterial Biofilm Formation, BBF)密切相关<sup>[2-3]</sup>。已有研究证实 BBF 在骨科植入物感染的发病机制中

起着重要作用<sup>[3]</sup>,因此抑制 BBF 是治疗骨科内植物感染的关键。然而,现代医学对与 BBF 相关的感染的治疗仍然有局限性。骨关节感染属于中医学的“附骨疽”范畴,为正气不足、邪毒深窜筋骨、肉腐蚀骨而成,治当扶正解毒化瘀驱邪<sup>[4]</sup>。在治疗方面,中药外治已逐渐显现出应用价值<sup>[5-10]</sup>。近年来,针对骨及内植物外露的肢体局部感染,笔者采用内部协定方解毒化瘀方局部外洗治疗,发现感染得到明显控制,为再次手术提供了较好的组织创面<sup>[6-10]</sup>。基于临床观察,本研究对该方体外影响致病菌生物膜形成进行分析,进而为中药治疗耐药金黄色葡萄球菌所致骨关节感染提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 解毒化瘀实验液及耐药菌株

黄芩、黄连、黄柏各 30 g,苦参、金银花、连翘、蒲公英、桃仁、乳香、没药、甘草各 20 g,加水 4 000 mL,浸泡 30 min,煎制 1 000 mL。所有中药均由河南省洛阳正骨医院中药房提供,均符合《中国药典》2005 版一部项下要求。按传统方法煎煮,微孔滤器过滤除菌。混合胰蛋白胍大豆肉汤培养基(Tryptic Soy Broth, TSB)1 000 mL 制备成解毒化瘀方初始液(简称为 J),放置于 4℃ 冰箱中保存。硫酸庆大霉素注射液(2 mL,8 万单位,广州白云山天心制药股份有限公司,批号 100305),甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(Methicillin Sensitive Staphylococcus Aureus, MSSA)对庆大霉素 MIC(Minimum Inhibitory Concentration)≤ 8 μg/mL。

将冻存 ATCC43300(耐药金黄色葡萄球菌,庆大霉素 MIC=64 μg/mL<sup>[11]</sup>)菌株快速解冻后,无菌条件下通过划线方法接种于胰大豆蛋白胍琼脂平板(Trypticase Soy Agar, TSA)上,在 37℃ 条件下细菌培养箱中静态培养;24 h 后挑取单菌落,接种于含 20 mL TSB 培养基的 50 mL 离心管中,放入恒温摇床,在 100 r/min,37℃ 有氧条件下培养 12 h;以移液枪吸取细菌悬液 1 mL 入 1.5 mL 离心管中,在 4℃,8 000g 条件下离心 8 min,吸去 TSB 培养基,离心管底部沉淀菌珠先用 PBS(Phosphate Buffer Saline)轻洗 3 次以去除剩余 TSB;再以 1 mL PBS 将底部沉淀菌珠吹打悬浮,根据麦氏比浊法确定菌悬液含菌量;最后根据如下实验设计以无菌 TSB,TSB-G(含庆大霉素的 TSB)或不同浓度的解毒化瘀方调整细菌含量为  $1 \times 10^8$  CFUs/mL。

### 1.2 实验分组

依据实验设计,取对数生长期上述细菌以不同处理方法调整至  $1 \times 10^8$  CFUs/mL,将菌悬液接种于放置无菌钛片的 48 孔细胞培养板中避光培养。本研究以解毒化瘀方不同稀释浓度或不同培育时间作为实验

分组依据,单纯 TSB、含庆大霉素 TSB(TSB-G, 32 μg/mL)与细菌孵育作为对照。

### 1.3 钛表面细菌黏附实验

根据解毒化瘀方初始液倍比稀释浓度分组。实验分 TSB 组(单纯 TSB 培养基),TSB-G 组(含庆大霉素 TSB),TSB-1/8J(解毒化瘀方初始液稀释至 1/8 含量)组,TSB-1/4J(解毒化瘀方初始液稀释至 1/4 含量)组,TSB-1/2J(解毒化瘀方初始液稀释至 1/2 含量)组,TSB-1J(解毒化瘀方初始液)组。将无菌钛片(直径 10 mm,厚度 3 mm)置入 48 孔板中,每组重复 6 孔。将细菌 ATCC 43300(不同处理方法调整为  $1 \times 10^8$  CFUs/mL,以下同此)以每孔 1 mL 分别加入 3 块含钛片的 48 孔板中,在培养箱 37℃ 避光孵育。6 h 后弃去培养液,PBS 轻洗 3 次以去除非黏附的浮游菌,然后通过如下方法进行检测。1)钛表面黏附细菌通过超声震荡技术洗脱,然后进行倍比稀释 TSA 涂板,培养箱 37℃ 培养,24 h 后细菌数量计为 CFUs/mL。2)细菌与钛片培养 6 h 后,取出材料并 PBS 轻洗 3 次去除非黏附的浮游菌,钛片以 2.5% 戊二醛溶液固定,梯度酒精脱水(50%,70%,80%,90% 及 100%),临界点干燥喷金,扫描电镜(SEM, JEOL JSM-6360LV,日本)观察细菌黏附情况。

### 1.4 钛表面细菌生物膜形成实验

1.4.1 根据解毒化瘀方初始液倍比稀释浓度分组 TSB,TSB-G,TSB-1/8J,TSB-1/4J,TSB-1/2J 及 TSB-1J 组。将无菌钛片(直径 10 mm,厚度 3 mm)置入 48 孔板中,每组重复 6 孔。将上述细菌(不同处理方法调整为  $1 \times 10^8$  CFUs/mL)以每孔 1 mL 分别加入 3 块含钛板的 48 孔板中,在培养箱 37℃ 避光孵育 24 h。1)结晶紫染色。规定时间点后,弃去培养液,PBS 轻洗 3 次,加入 0.1% 结晶紫水溶液 1 mL,室温染色 20 min,倒出染色液用去离子水轻轻洗涤 3 次;45℃ 烘箱干燥后,加 95% 乙醇溶液 0.5 mL 脱色,将脱色液移入 96 孔板,用酶标仪在 492 nm 检测吸光度值(OD 值)。2)CLSM(Confocal Laser Scanning Microscope)观察。规定时间点后,去除培养液,PBS 轻洗 3 次,将表面覆盖生物膜的钛片以 Live/Dead 试剂盒进行荧光染色。试剂盒荧光染液 SYTO 9 能使活菌显现绿色荧光,PI(Propidium Iodide)可使死菌显现红色荧光,最后在激光共聚焦显微镜(Leica TCS,SP2,德国)下观察生物膜的形态。

1.4.2 根据解毒化瘀方 1/2 稀释浓度的不同孵育时间分组 TSB(单纯 TSB 培养基)、TSB-G(含庆大霉素 TSB)、TSB-6J(解毒化瘀方孵育 6 h)、TSB-12J(解毒化瘀方孵育 12 h)、TSB-18J(解毒化瘀方孵育 18 h)及 TSB-24J(解毒化瘀方孵育 24 h)组。将无菌钛片

(直径 10 mm, 厚度 3 mm) 置入 48 孔板中, 复孔及处理方法同 1.3 节。在不同时间点通过结晶紫染色定量分析各处理方法对细菌生物膜的影响。

### 1.5 统计学方法

使用 SPSS19.0 软件进行数据分析。实验数据中的计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 若满足正态性和方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间差异有统计学意义, 则进一步采用 LSD 法进行两两比较; 若不满足正态性和方差齐性, 采用非参数检验 (Kruskal-Wallis 法),  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 抑制细菌黏附结果

菌株与钛片共孵育 6 h 后显示 (图 1): 相对于 TSB, TSB-G 及 TSB-1/8J 组, TSB-1/4J, TSB-1/2J 及 TSB-1J 组可明显抑制细菌在钛表面的黏附, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而在 TSB, TSB-G 及 TSB-1/8J 组, 钛表面细菌均有明显黏附, 且组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。对于不同解毒化瘀方稀释浓度下, 组间的细菌黏附定量分析差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 且存在随着稀释浓度的增加, 抑制黏附效果越明显趋势。

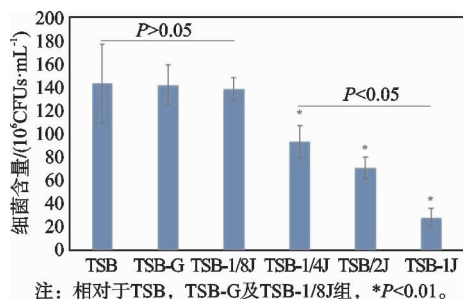


图 1 细菌黏附定量分析

菌株与钛片共孵育 6 h 后 SEM (图 2) 显示: TSB-1/4J, TSB-1/2J 及 TSB-1J 组钛表面可见散在的菌落黏附, 而菌落在 TSB 及 TSB-G 组钛表面明显聚集成团块状。对于 TSB-1/8J, TSB-1/4J, TSB-1/2J 及 TSB-1J 组, 随着稀释倍数的增加, 钛表面细菌黏附更明显。SEM 定性分析与图 1 结论一致, 解毒化瘀方可抑制细菌在钛表面黏附, 并与浓度存在依赖关系。

### 2.2 抑制细菌生物膜形成结果

1) 解毒化瘀方不同稀释浓度的影响。结晶紫染色结果见图 3, 与 TSB, TSB-G 及 TSB-1/8J 组相比, TSB-1/4J, TSB-1/2J 及 TSB-1J 组钛表面细菌生物膜形成较少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 且存在随着解毒化瘀方浓度的增加, 抑制细菌生物膜形成的能力增强的趋势。而相对于 TSB, TSB-G 及 TSB-1/8J 组, 菌株在钛表面形成生物膜的定量分析基本一致, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

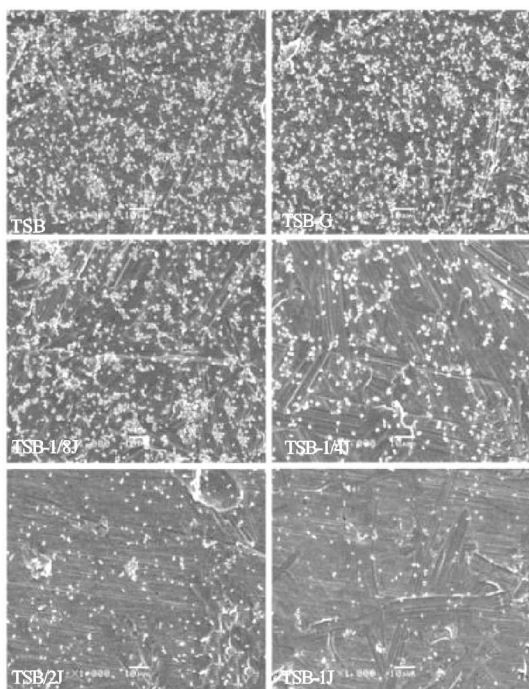


图 2 细菌黏附的 SEM (1 000×)

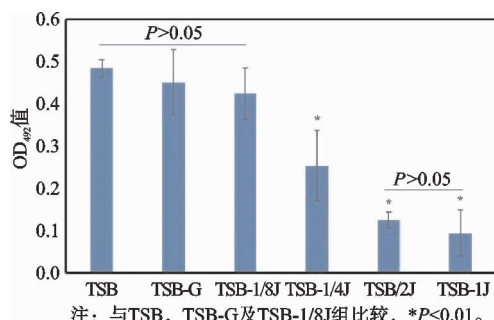


图 3 不同稀释浓度下生物膜形成结晶紫染色

CLSM 显示 (图 4): 不同培养基条件下, 钛表面显示出不同的生物膜荧光强度。TSB, TSB-G 及 TSB-1/8J 组钛表面高强度荧光提示大量细菌菌落聚集并形成生物膜。TSB-1/4J, TSB-1/2J 及 TSB-1J 组钛表面荧光强度均较低, 表示低程度的细菌生物膜形成, 并与解毒化瘀方原始液稀释浓度存在依赖关系。

2) 解毒化瘀方 1/2 稀释浓度不同孵育时间影响。结晶紫染色 (图 5) 显示: 在不同时间点, 菌株在 TSB 及 TSB-G 组钛表面黏附并逐步形成生物膜, 并随着时间的延长生物膜 OD 值呈升高趋势。相反, 随着时间延长, TSB-1/2J 组钛表面无明显生物膜形成, OD 值呈平稳低值趋势, 与 TSB 及 TSB-G 组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

骨科内植物术后, 由于手术局部免疫防御功能破坏, 致病菌容易在植入物及宿主骨关节表面黏附定植, 并增殖聚集形成具有自我保护功能的细菌生物膜<sup>[2-3, 11]</sup>。随着对骨关节内植物感染发病机制的更深



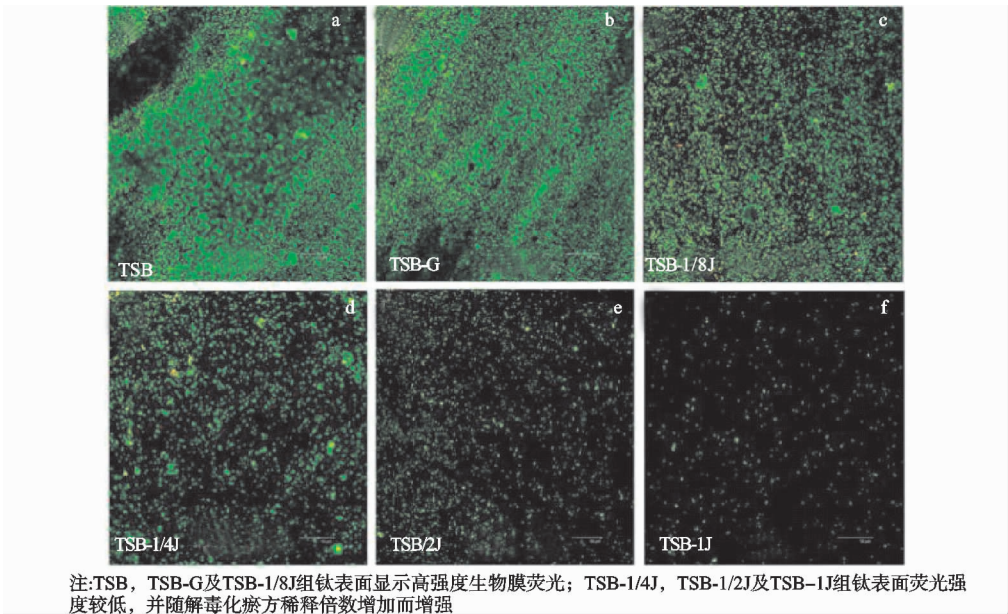


图 4 钛表面生物膜 CLSM(400×)

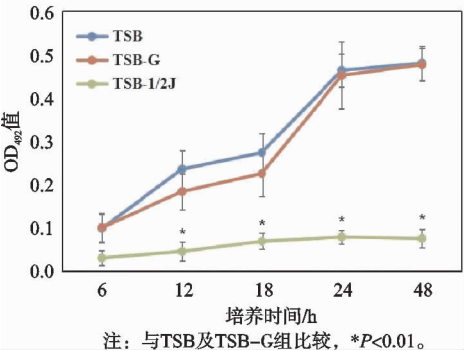


图 5 不同培养时间生物膜结晶紫染色

入研究,发现细菌生物膜在整个感染的发展进程中起着关键性作用<sup>[2-3]</sup>。在生物膜存在状态下,膜内细菌对抗生素的耐药性将是普通浮游状态下同种细菌的1 000倍,这与细菌的生理代谢发生改变及受到膜内基质的保护密切相关<sup>[12]</sup>。由于生物膜的存在,抗菌药物仅对膜表层的细菌有杀灭效应,而对生物膜内层细菌无效。此外,生物膜还可阻止机体正常的免疫反应,使膜内细菌逃避宿主的免疫作用,进而使感染更加难以有效控制,甚至迁延不愈<sup>[13]</sup>。因此,临床常用的全身或局部单纯的抗生素治疗,往往难以达到满意的控制感染效果。

相对现代医学的缺憾,祖国医学的相关文献则报道了中医药外用在骨关节感染防治方面的应用价值<sup>[5-7,14-16]</sup>。如中药外治对感染伴骨皮缺损创面具有抗感染作用、全身及局部免疫调节作用,可促进创面肉芽组织生长,对慢性感染的控制有着独特的优势<sup>[15]</sup>。针对耐药菌引起的肢体感染伴骨及内植物外露患者,根据“冲洗效应”及中药“煨脓长肉”机理,笔者多年来采用解毒化瘀方浸泡创面的治疗方法,通过大量的病例观察,发现治疗后肢体局部感染明显得到控制,组织

红肿消退,坏死组织脱落,分泌物减少,肉芽组织生长良好,为再次手术及术后创面愈合提供了较好的组织条件。组成方中黄芩、黄连、黄柏、金银花、连翘、蒲公英等为清热解毒药物,具有广泛的抗菌抑菌作用,且联合未见细菌产生耐药性;桃仁、乳香、没药可活血行气、消肿生肌,改善局部微循环。该方应用可起到抗菌消炎,改善创面缺血,增强局部免疫力,进而达到消除感染、促进创面愈合的目的<sup>[6-7,15]</sup>。

本研究针对骨科常用的植入材料钛及引起感染常见致病菌金黄色葡萄球菌为研究对象<sup>[17-18]</sup>,通过体外实验观察解毒化瘀方对骨科常见致病菌在钛表面黏附及生物膜形成的影响,从而评估该方外洗作为治疗骨关节感染的潜在价值。从本研究结果来看,无论是定量还是定性分析,解毒化瘀方可抑制 ATCC43300 在钛表面的初始黏附。一般来讲,致病菌在载体表面的4~6 h时间点的初始黏附,对生物膜的进一步形成起着关键性作用<sup>[11]</sup>。如果阻断或抑制致病菌的初始黏附,将可极大地提高对感染的局部治疗效果。细菌黏附后没有得到积极的干预,其就会在载体表面增殖聚集,在多种因素参与下逐渐形成难治性的细菌生物膜。本研究通过对不同培养条件下钛表面细菌生物膜的结晶紫染色及 CLSM 观察分析,发现细菌均可在 TSB 组钛表面形成致密的结构生物膜;由于对庆大霉素的耐药性,细菌也可在 TSB-G 组钛表面形成明显的生物膜。而在解毒化瘀方不同浓度干预的观察组,除了低浓度的 TSB-1/8J 组形成和对照组一样的生物膜外,外洗方原液、1/2 及 1/4 稀释浓度组的钛表面虽有细菌的定殖及聚集,但细菌生物膜的形成明显受到了抑制,尤其是 TSB-1/2J 及 TSB-1J 组表现的抑制作用更加明显。同样,在不同的观察时间点,对照组细菌生物

膜形成也明显超过了 TSB-1/2J 观察组。由此可见,解毒化瘀方可抑制细菌在钛表面形成生物膜,并与解毒化瘀方稀释浓度及孵育时间存在依赖关系。

总之,体外研究表明:相对于 TSB 及 TSB-G 组,高浓度的解毒化瘀方可明显抑制耐药金黄色葡萄球菌在钛表面的黏附及细菌生物膜的形成,其效用与解毒化瘀方浓度及孵育时间存在依赖关系。因此,该方外用可作为由耐药菌株所引起的与细菌生物膜相关的骨关节感染局部治疗的有效措施。

参考文献

[1] STEINMETZ S,WERNLY D,MOERENHOUT K,et al. Infection after fracture fixation[J]. EFORT Open Rev, 2019,4(7):468-475.

[2] 杨培丽,王丽娟,王奕翔,等. 关节假体感染细菌生物膜的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 1113-1116.

[3] ARCIOLA C R,CAMPOCCIA D,MONTANARO L. Im-plant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion[J]. Nat Rev Microbiol, 2018,16(7):397-409.

[4] 刘艳,谭艳庆,顾诗颖,等. 数据挖掘慢性化脓性骨髓炎的中药处方规律[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(3): 38-41.

[5] 任敬,郝阳泉,刘德玉. 中药抗感染洗剂治疗骨外伤性创面感染 57 例[J]. 陕西中医学院学报, 2011, 34(1): 59-60.

[6] 李刚,马岚. 活血化瘀中药口服联合三黄生新汤外洗治疗复合组织瓣修复术后感染临床研究[J]. 中华高血压杂志, 2015, 23(1): 167-168.

[7] 李刚,程春生. “祛瘀生新”理论指导下胫腓骨骨皮瓣游离移植术后二次感染治疗临床研究[J]. 新中医, 2015, 47(1): 135-137.

[8] 陈可新,刘兴才,赵丽艳. 中药熏洗配合组合式外固定架治疗胫骨干感染性骨不连[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(8): 57-58.

[9] 姚俊娜,程春生,赵祚堪. 逆行股前外侧皮瓣结合中药熏洗治疗胫骨近段感染性骨皮缺损[J]. 中国中医骨伤科杂

志, 2014, 22(6): 19-20.

[10] 钟文龙,崔亚鸽,杨思敏,等. 中药内服外用治疗骨科外伤性感染创面 58 例[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(1): 137-139.

[11] TAM H,AO H,MA R,et al. In Vivo effect of quaternized chitosan-loaded polymethylmethacrylate bone cement on methicillin-resistant staphylococcus epidermidis infection of the tibial metaphysis in a rabbit mode[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(10): 6016-6023.

[12] POST V,WAHL P,RICHARDS R G,et al. Vancomycin displays time-dependent eradication of mature Staphylococcus aureus biofilms[J]. J Orthop Res, 2017, 35(2): 381-388.

[13] ZHANG Y Q,ZHAO Y L,DONG D,et al. Effects of isosorbide mononitrate loaded nanoparticles conjugated with antistaphylococcus aureus  $\alpha$ toxin on staphylococcus aureus biofilms[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(2): 1267-1274.

[14] 王旭东,胡海波,王振山,等. 中药对细菌生物被膜作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(7): 2248-2252.

[15] 程春生,金永翔,程真真. 中西医结合治疗创伤感染性小腿骨皮缺损 267 例临床观察[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(9): 535-538.

[16] 敬戈,杨彦君,唐良华,等. 泻心汤对表皮葡萄球菌的抑菌[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35(4): 36-41.

[17] SURESH M K,BISWAS R,BISWAS L. An update on recent developments in the prevention and treatment of staphylococcus aureus biofilms[J]. Int J Med Microbiol, 2019, 309(1): 1-12.

[18] PILATO VD,CECCHERINI F,SENNATI S,et al. In vitro time kill kinetics of dalbavancin against staphylococcus spp. biofilms over prolonged exposure times[J]. Diagn Micr Infec Dis, 2020, 96(2): 114901.

(收稿日期:2020-02-08)

广告目次

1. 广东省医药进出口公司珠海公司	2. 陕西盘龙药业集团股份有限公司
同息通 ..... 封三	盘龙七片 ..... 封四