

• 论 著 •

黄连提取液对多重耐药鲍曼不动杆菌的抑菌作用及其生物膜的影响^{*}

余艳妮¹, 覃艳春², 蓝 怡¹, 崔文卿¹, 葛珍珍¹, 何一恒¹, 李 笑¹, 杨 珊^{2△}

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 右江民族医学院病原生物学与免疫学教研室, 广西 百色 533000)

[摘要] **目的** 探讨黄连提取液对多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-Ab)抑菌作用及其对细胞膜的影响, 为黄连提取液治疗 MDR-Ab 提供理论依据。**方法** 2023 年 5 月采用牛津杯法测定黄连提取液对 MDR-Ab 的最低抑菌浓度(MIC), 扫描电镜观察黄连提取液对 MDR-Ab 菌体结构的破坏, 碘化丙啶染色法观察黄连提取液对 MDR-Ab 生物膜的作用, 检测黄连提取液对 MDR-Ab 作用后细胞内外三磷酸腺苷(ATP)含量。**结果** 黄连提取液对 MDR-Ab 的 MIC 为 64 mg/mL。黄连提取液处理的 MDR-Ab 菌体形态发生凹陷、扭曲等改变, 大部分染成红色, 且其形态改变程度、染成红色比例均与黄连提取液浓度呈正比。MDR-Ab 细胞内 ATP 含量随黄连提取液浓度增高逐渐减少, 细胞外 ATP 含量随黄连提取液浓度增高逐渐增多。**结论** 黄连提取液对 MDR-Ab 具有抑菌作用, 且通过破坏 MDR-Ab 细胞膜发挥抑菌作用。

[关键词] 黄连; 多重耐药鲍曼不动杆菌; 生物膜

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.16.002

中图法分类号:R378;R282.71

文章编号:1009-5519(2024)16-2708-05

文献标识码:A

Antibacterial effect of Coptis chinensis extract on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and its effect on biofilm^{*}

YU Yanni¹, QIN Yanchun², LAN Yi¹, CUI Wenqing¹, GE Zhenzhen¹,
HE Yiheng¹, LI Xiao¹, YANG Shan^{2△}

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China;

2. Department of Pathogenic biology and Immunology, Youjiang

Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the antibacterial effect of Coptis chinensis extract on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR-Ab) and its effect on cell membrane, and to provide theoretical basis for the treatment of MDR-Ab by Coptis chinensis extract. **Methods** In May, 2023, the minimum inhibitory concentration (MIC) of Coptis chinensis extract on MDR-Ab was determined by Oxford cup method. The structural damage of MDR-Ab was observed by scanning electron microscope. The effect of Coptis chinensis extract on MDR-Ab biofilm was observed by propidium iodide staining. The extracellular and extracellular adenosine triphosphate (ATP) contents of Coptis chinensis extracts were detected after MDR-Ab treatment. **Results** The MIC of Coptis chinensis extract on MDR-Ab was 64 mg/mL. The morphology of MDR-Ab treated with Coptis chinensis extract changed, such as depression and distortion, and most of them were dyed red, and the degree of morphological change and the proportion of dyed red were in direct proportion to the concentration of Coptis chinensis extract. The ATP content in MDR-Ab cells decreased gradually with the increase of the concentration of Coptis chinensis extract, and the ATP content outside the cells increased gradually with the increase of the concentration of Coptis chinensis extract. **Conclusion** Coptis chinensis extract has antibacterial effect on MDR-Ab, and it can exert antibacterial effect by destroying MDR-Ab cell membrane.

[Key words] Coptis chinensis; Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*; Biofilm

鲍曼不动杆菌(Ab)是医院内 6 种(粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、Ab、铜绿假单胞菌和肠

^{*} 基金项目: 右江民族科学技术局医学院校级科研基金项目(yy2020ky025); 大学生创新创业训练计划项目(S202110599094; S202210599107); 百色市科学研究与技术开发计划项目(20203403)。

作者简介: 余艳妮(2002—), 本科, 主要从事中药的抗菌机制研究。 △ 通信作者, E-mail: 380266434@qq.com。

杆菌等)主要的具有严重耐药病原体 ESKAPE 之一,可引起多种医院获得性感染和严重的治疗并发症,包括严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 相关肺炎^[1]。Ab 还会引起社区获得性感染,死亡率高达 64%^[2]。Ab 具有较强的生命力,可在干燥的环境中存活较长时间。其具有较强的附着力,容易黏附在物体表面,形成生物膜抵抗抗菌药物,从而产生耐药性^[3-4]。临床存在多重耐药 Ab(MDR-Ab)和完全耐药 Ab。MA-RAKI 等^[5]研究表明,临床分离的 Ab 中 92.89% 存在 3 种或 3 种以上的抗菌药物耐药,MDR-Ab 诱导或加重了医院内患者,尤其是重症监护病房的重症患者的感染,使病情进一步恶化,给临床治疗及预防工作带来的影响越来越引起广泛重视^[6]。为防止临床致病菌的耐药性加重、给临床工作提供更加有效的治疗方案,如何预防和控制 MDR-Ab 的感染已是全球医院需解决的难题,2017 年 Ab 已在世界卫生组织优先开发新药的病原体清单中占据首位。

中药具有独特的优势,如作用靶点多、药理活性强、不良反应少、具有突出的抗耐药性等作用。黄连为毛茛科植物黄连(*Coptis chinensis Franch.*)、三角叶黄连或云南黄连的干燥根茎。始载于《神农本草经》,为我国常用中药之一,能泻火、解毒、清热、燥湿等。现代药理研究表明,黄连具有抗菌、抗内毒素、抗病毒、增强免疫、解热、抗溃疡、降血糖、解毒等作用^[7-8]。黄连对 MDR-Ab 的作用少见相关文献报道。本研究探讨了黄连提取物新的药理作用,进一步开发成新药,为其用于治疗临床 Ab 感染性疾病提供理论依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中药 黄连购于广西壮族自治区百色市大参林药店,经右江民族医学院药学院梁威教授鉴定为黄连。

1.1.2 实验菌株 MDR-Ab 8D2 临床分离菌株经梅里埃细菌鉴定药敏仪鉴定为 Ab,主要耐哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/克拉维酸、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素等抗菌药物。

1.1.3 主要试剂和仪器 碘化丙啶(PI)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司)、SOO27 三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司)、D3024R 高速冷冻型微量离心机(南北仪器有限公司)、Synergy H1 多功能酶标仪(上海新领生物科技发展有限公司)、SBC-12 小型离子溅射仪(北京中科科仪股份有限公司)、KYKY-EM8100 扫描电子显微镜(北京中科科仪股份有限公司)、PA53FS6 正置荧光显微镜(厦门麦克奥迪实业集团有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 提取黄连提取液 2023 年 5 月采用煎煮法提取黄连提取液^[9]。将 90 g 黄连加入 900 mL 蒸馏水(1:10)加热煮沸后文火煎煮,提取时间大概 1 h。纱布过滤,收集滤液,药渣继续加 900 mL 蒸馏水煎煮,步骤与上一步骤相同。合并 2 次滤液蒸发浓缩体积为 25 mL 左右,等待冷却后用保鲜膜封口,冰箱冷冻,再进行真空冷冻干燥。

1.2.2 测定黄连提取液最低抑菌浓度(MIC) 肉汤培养基(LB)培养液稀释光密度(OD)600 到 0.3,此时菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL,取无菌 1.5 微量离心管(EP)管 5 支,用二倍稀释法将黄连提取液在 1.5 EP 管中以无菌水稀释为 512、256、128、64、32 mg/mL 备用,编号 1~5。取 5 个空白培养基,编号 1~5。采用牛津杯法向编号 1~5 的空白培养皿中加入 2% 素琼脂,冷却后将牛津杯放置在素琼脂上轻轻按压至不留间隙,将 100 μ L 配制好的菌液与 0.7% LB 琼脂混匀后倒在素琼脂上,凝固后轻轻旋转拿出牛津杯,分别加入配制好的药液 100 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后观察有无抑菌圈,测量抑菌圈直径,平行实验 3 次。

1.2.3 测定黄连提取液对 MDR-Ab 生长曲线的影响 将 1.5×10^8 CFU/mL 菌液 100 μ L 接种于无菌 96 孔板第一排的 1~6 孔中,将 256、128、64、32、16 mg/mL 黄连提取液各 100 μ L 加入 1~5 孔中,第 6 孔空白对照组加入 LB 培养液 100 μ L,第 7 孔加入 LB 培养液 200 μ L,每组 3 个复孔。用多功能酶标仪 $A_{570\text{ nm}}$ 处每 2 小时测量 A 值,以培养时间为横坐标,测出的 A 值为纵坐标绘制 24 h 生长曲线。

1.2.4 扫描电子显微镜观察黄连提取液对 MDR-Ab 8D2 的破坏作用 取 1.5 EP 管 12 支分为空白对照组和黄连组(包括 1/4MIC 组、1/2MIC 组和 MIC 组),每组 3 支。黄连组配制浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌液 750 μ L 分别与 1/4MIC、1/2MIC、MIC 黄连提取液 750 μ L 混合。空白对照组加入 750 μ L 的菌液和 LB 培养液 750 μ L。所有样品均在恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h。取出后以 12 000 r/min 离心 5 min 取上清液,加入戊二醛溶液在 4 $^{\circ}$ C 冰箱固定过夜。第 2 天取出后离心,依次加入 30%、50%、70%、80%、90%、100% 乙醇溶液各 1 次,每次 30 min。放入烘箱烘干,真空条件下镀金处理,用扫描电子显微镜观察每组样品,随机挑选若干视野拍照。

1.2.5 荧光显微镜观察黄连提取液对 MDR-Ab 的破坏作用 配制浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的菌液。取 2 个 50 mL 离心管,编号 1~2。编号 1 的离心管加入菌液和 64 mg/mL 的黄连提取液各 3 mL,编号 2 的离心管加入菌液 3 mL 和空白 LB 培养液。恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 取出后以 12 000 r/min 离心 1 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,最后一次离心后弃上清液,分别加入 PI 试剂 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 培养

30 min,取出后以 12 000 r/min 离心 1 min,用 PBS 洗涤 2 次,弃上清液,分别加入 PBS 使其沉淀悬浮起来,取 5 μ L 制片。在正置荧光显微镜下观察细菌的染色情况,视野下 PI 染色死细胞呈红色。

1.2.6 测定 MDR-Ab 8D2 细胞内外 ATP 含量 取 6 支 1.5 EP 管,编号 1~6。菌株划线纯化后挑取单个菌落至 5 mL LB 培养基中,摇菌 16 h。第二天以 1:10 比例转到 50 mL 新鲜培养基中,继续摇菌 4 h。5 000 r/min 离心 10 min,用 PBS(pH=7.4)洗涤和重悬细胞 3 次,调配制 OD600=0.5,吸取调制好的菌液 500 μ L 分别加入 EP 管中,加入 1/4MIC、1/2MIC、MIC、2MIC、4MIC 的黄连提取液 500 μ L 到编号 1~5 号 EP 管中,6 号 EP 管加入 LB 培养液 500 μ L 作为空白对照组,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 1 h。菌悬液 4 $^{\circ}$ C,以 12 000 r/min 离心 5 min。吸取 100 μ L ATP 检测工作液(ATP 检测试剂和 ATP 检测试剂稀释液为 1:4),分别加入 16196-3SSB96 孔板(黑色)中等待 3 min,再分别加入 6 支 EP 管中的上清液 20 μ L,迅速混匀,间隔 5 s 后用多功能酶标仪测定细胞外 ATP 含量。在弃上清液的 6 支 EP 管中分别加入 400 μ L 裂解液,37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min,充分裂解细菌。裂解后 4 $^{\circ}$ C、12 000r/min 离心 5 min,取上清液,用于测定细胞内 ATP 含量。每孔加入 ATP 检测工作液 100 μ L 到 16196-3SSB96 孔板(黑色)中,室温孵育 5 min,充分消耗本底 ATP,加入上清液 20 μ L 迅速用移液枪混匀,间隔 5 s 后用酶标仪测定细胞内 ATP 含量。平行实验 3 次。

1.3 统计学处理 应用 WPS、GraphPadPrism8 软件作图,应用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料以率或构成比表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)、 χ^2 检验等。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 黄连提取液 MIC 黄连提取液 MIC 为 64 mg/mL。见表 1。

表 1 黄连提取液 MIC

质量浓度(mg/mL)	细菌生长情况	抑菌圈大小(mm)
32	有	0
64	无	13
128	无	14
256	无	16

2.2 黄连提取液对 MDR-Ab 8D2 生长曲线的影响 MDR-Ab 8D2 生长曲线大致呈“S”型,具有对数生长期和稳定生长期。MIC、2MIC 组细菌生长被明显抑制。随时间增长,MIC 组细菌生长曲线无太大的浮动,说明黄连提取液对 MDR-Ab 8D2 的生长具有

明显的抑制作用。见图 1。

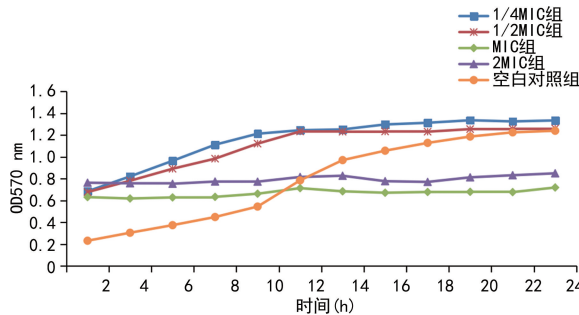
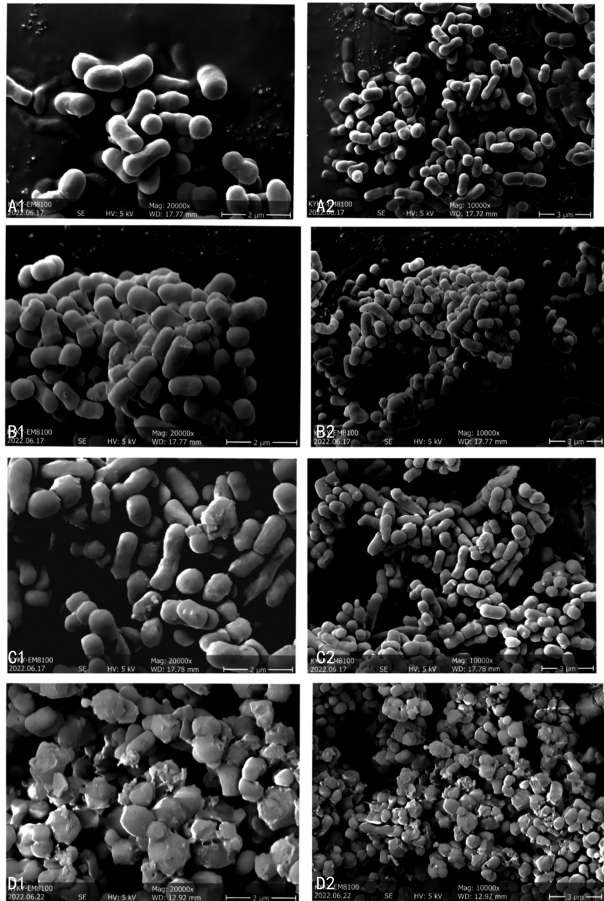


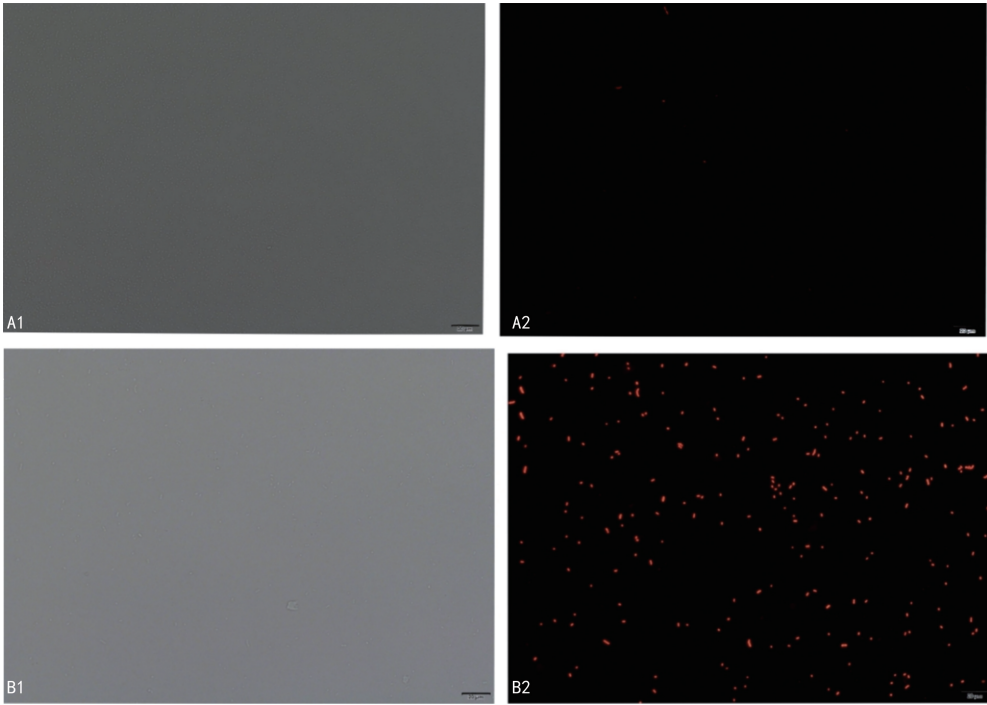
图 1 黄连提取液对 MDR-Ab 8D2 生长曲线的影响

2.3 黄连提取液对 MDR-Ab 8D2 的破坏 空白对照组菌体形态正常饱满,细胞膜结构完整。与空白对照组比较,1/4MIC 组少量菌体形态不正常饱满,菌体表面开始皱缩;1/2MIC 组多数菌体表面皱缩,少许菌体细胞膜开始破损,MIC 组大量细菌的细胞膜表面破裂,细菌形态严重变化。表明黄连提取液能破坏细菌形态,且随黄连提取液浓度增高细菌菌体表面开始皱缩,细胞膜破损逐渐严重,形态逐渐发生改变。见图 2。空白对照组菌体 PI 染色少,细菌生长良好;黄连组菌体 PI 染色增多(占 80%),且染成红色比例与黄连提取液浓度呈正比。见图 3。



注:A1、A2 为空白对照组;B1、B2 为 1/4MIC 组;C1、C2 为 1/2MIC 组;D1、D2 为 MIC 组。

图 2 黄连提取液对 MDR-Ab 8D2 形态的影响

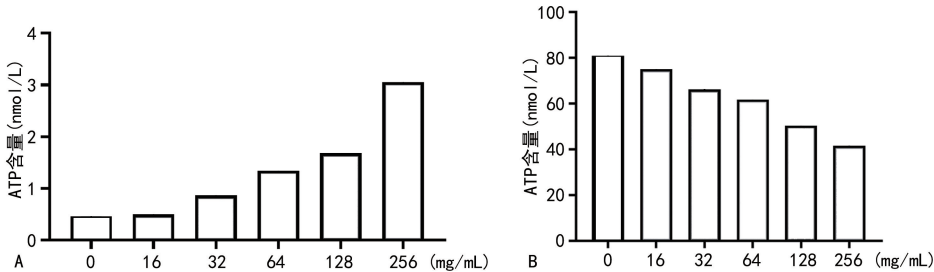


注：A1、A2 为空白对照组；B1、B2 为黄连组。

图 3 PI 染色

2.4 细胞内外 ATP 含量变化 细胞内 ATP 含量随黄连提取液浓度增高逐渐减少，细胞外 ATP 含量随

黄连提取液浓度增高逐渐增多。见图 4。



注：A 为细胞外 ATP 含量；B 为细胞内 ATP 含量。

图 4 细胞内外 ATP 含量变化

3 讨 论

细菌生物膜是一种结构复杂、功能多样的“动态细菌组织”，可帮助细菌抵抗恶劣的外界环境，是大部分细菌的主要生活方式^[10-11]。有研究发现，中药抗菌作用主要通过抑制细胞壁的合成、提高细胞膜的渗透性、抑制蛋白质、核酸的代谢、防止外膜蛋白的丢失、阻断药物的主动外排，从而抑制细菌的生长，发挥抗菌作用，黄连对 Ab 具有良好的抗菌活性，黄连通过改变 Ab 细胞膜的渗透性，破坏细胞膜完整性而发挥抗菌作用^[12]。

细菌在药物干扰下会出现不同程度的形态改变，可通过扫描电子显微镜进行观察^[13]。在没有被药物干扰时细菌形态完整、饱满，无缺水皱缩现象，细胞壁、细胞膜结构完好；细菌受到某些刺激时细胞形态就改变。由本研究图 2 可见，MDR-Ab 8D2 菌体形态可被黄连提取液影响，形态发生变形，且影响程度与

黄连提取液浓度呈正比。

PI 不能穿入完整的活细胞膜中，只能通过受损的细胞膜^[14]，随后与 DNA 结合并发出红色荧光。由本研究图 3 可见，黄连组菌体 PI 染色后红色荧光增多，提示黄连提取液通过破坏 MDR-Ab 8D2 细胞膜使菌体大量死亡。细菌生物膜被包裹在细胞外基质中，在发病机制中起关键作用，使治疗选择更加困难^[15]。Ab 也有形成生物膜的能力，因此，探讨中药抗 Ab 生物膜意义重大。

对中药抗 Ab 生物膜机制的研究发现，许多中药具有抑制 Ab 生物膜形成和破坏生物膜的作用^[16]，如李晓君等^[17]发现，5 种中药颗粒剂可能对细菌内叶酸合成途径及细菌蛋白质形成产生影响，中药提取物可通过抑制细菌 DNA 合成和膜蛋白合成从而破坏生物膜。Ab 生物膜的形成是一个复杂的过程，需要群体感应基因 (QS)、bap、blaPER-1、csuE、ompA 等生物

膜相关基因的参与^[18]。相关研究表明, QS 达到一定浓度后可参与细菌生物膜的形成和毒力因子的表达, QS 与抗菌药物不同, 不会对细菌产生选择压力, 进而减少抗性突变体的出现和传播。黄连可能通过抑制 DNA 合成、膜蛋白合成和 QS 破坏大肠杆菌的生物膜。

ATP 是生物体细胞内的能量来源^[19], 在呼吸和代谢中起着核心作用, 是许多酶促反应中最重要的能量提供者, ATP 合成酶在 MDR-Ab 菌株中被高度上调^[20-21]。微生物的膜电位是由钠、钾、氯、镁、氢等离子浓度梯度产生和维持, 如细菌膜受损, 小离子就会被滤出, 因此, 细胞内释放的 ATP 等成分的测定也可用于监测黄连提取液引起的膜损伤。微生物中 ATP 含量的测量可以与活力、代谢活力或利用细胞内 ATP 的平均浓度或量有关^[22]。本研究结果显示, 细胞内 ATP 含量与黄连提取液浓度呈反比, 性别外 ATP 含量与黄连提取液浓度呈正比, 进一步说明黄连提取液处理 MDR-Ab 8D2 后使其细胞膜受损, 细胞内 ATP 外漏。

综上所述, 黄连提取液可有效抑制 MDR-Ab 8D2 的生长, 其抑菌机制可能与破坏菌体形态、影响细胞膜的通透性和完整性有关。

参考文献

[1] MULANI M S, KAMBLE E E, KUMKAR S N, et al. Emerging strategies to combat ES-KAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance; a review[J]. Front Microbiol, 2019, 10:539.

[2] ABABNEH Q, ABU LAILA S, JARADAT Z. Prevalence, genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm formation of acinetobacter baumannii isolated from urban environments [J]. J Appl Microbiol, 2022, 133(6):3617-3633.

[3] CHIANG T T, HUANG T W, SUN J R, et al. Biofilm formation is not an independent risk factor for mortality in patients with acinetobacter baumannii bacteremia[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12:964539.

[4] LI H, DU X, CHEN C, et al. Integrating transcriptomics and metabolomics analysis on kojic acid combating acinetobacter baumannii biofilm and its potential roles[J]. Microbiol Res, 2022, 254:126911.

[5] MARAKI S, MANTADAKIS E, MAVROMANOLAKI V E, et al. A 5-year surveillance study on antimicrobial resistance of acinetobacter baumannii

clinical isolates from a tertiary greek hospital[J]. Infect Chemother, 2016, 48(3):190-198.

[6] 侯良, 周瑞芬, 刘华之, 等. 鲍曼不动杆菌临床分布特点及耐药性监测分析[J]. 当代医学, 2018, 24(15):52-54.

[7] 蒋丽施, 李潇彧, 罗曦, 等. 黄连的研究进展及其质量标志物预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(8):97-109.

[8] 王茹, 关亮俊, 陈两绵, 等. 黄连等 6 味中药中生物碱苷类成分的发现、分离和结构鉴定[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(17):4598-4609.

[9] 吕益飞, 谭予钒, 杨贵蓉, 等. 黄连水提物对小鼠白色念珠菌性阴道炎的影响[J]. 遵义医学院学报, 2016, 39(3):255-259.

[10] GUO H B, HUANG H L, LI Y Y. Detection and homology analysis of carbapenem resistant Acinetobacter baumannii resistance gene[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 12:987260.

[11] ALEKSANDROWICZ A, CAROLAK E, DUT-KIEWICZ A, et al. Better together-salmonella biofilm-associated antibiotic resistance[J]. Gut Microbes, 2023, 15(1):2229937.

[12] 汤嘉文, 李培源. 中药抗菌活性及作用机制研究[J]. 山东化工, 2019, 48(20):78-79.

[13] 廖清松. 浅谈鲍曼不动杆菌的耐药机制[J]. 健康必读, 2020(5):42-46.

[14] 万朋奇. 抗菌聚氨基酸的合成及其构效关系的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2022.

[15] GEDEFIE A, DEMSIS W, ASHAGRIE M, et al. Acinetobacter baumannii biofilm formation and its role in disease pathogenesis; a review [J]. Infect Drug Resist, 2021, 14:3711-3719.

[16] 罗彬, 王佳贺. 鲍曼不动杆菌的中药治疗[J]. 实用药物与临床, 2023, 26(2):177-179.

[17] 李晓君, 邓超, 谭俊青, 等. 黄连等五种中药颗粒剂对鲍曼不动杆菌生物膜耐药性及相关基因的作用分析[J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(2):313-317.

[18] YANG C H, SU P W, MOI S H, et al. Biofilm formation in acinetobacter baumannii: genotype-phenotype correlation [J]. Molecules, 2019, 24(10):1849.

[19] MEMPIN R, TRAN H, CHEN C, et al. Release of extracellular ATP by bacteria during growth [J]. BMC Microbiol, 2013, 13:301-305.

[20] KHOSHNOOD S, GOUDARZI M, TAKI E, et al. Bedaquiline; current status(下转第 2718 页)