

型变态反应性疾病药物的有效、简便手段之一。过敏介质组胺及乙酰胆碱是引起回肠平滑肌收缩及诱发变态反应的主要递质,而且乙酰胆碱、组胺又为 M_1 、 H_1 受体完全激动剂。

蜂斗菜在民间用于治疗扁桃体炎,毒蛇咬伤,在临床实验中也用于治疗过敏性鼻炎。本实验结果表明,蜂斗菜不同提取物有明显的阻断过敏介质组胺的作用和拮抗乙酰胆碱兴奋豚鼠离体回肠平滑肌的作用,说明蜂斗菜不同提取物具有较好的抗过敏作用,且可能与 M_1 、 H_1 受体的抑制有关。其中乙酸乙酯提取物硅胶柱色谱的馏分 PJE-B-3 的抑制作用最强,表明蜂斗菜抗过敏作用的有效成分主要是脂溶性成分。此研究为进一步筛选出蜂斗菜抗过敏有效成分奠定了基础。

REFERENCES

- [1] MIAO Y L. Study on the chemical components of *Petasites tatewakianus* Kitam [D]. Shandong University(山东大学), 2010.

- [2] SHIMODA H, TANAKA J, YAMADA E, et al. Anti type I allergic property of Japanese butterbur extract and its mast cell degranulation inhibitory ingredients [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(8): 2915-2920.
- [3] MA X S, FAN X P, CHEN Z, et al. Effects of Rhizoma Atractylodis macrocephalae on contraction of isolated ileum of guinea pig [J]. Chin J New Gastroenterol, 1996, 4(11): 603-604.
- [4] TAO Y, XIAO Y X, YI J P, et al. Study the effect of *Glechoma hedracea* ethanol extracts on the smooth muscle of isolated ileum of guinea pig and mice intestine movement function [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2003, 26(10): 746-747.
- [5] GUO J S, NIE Z W, ZHANG M, et al. The influence of the extraction of combined spicebush root to the ileum from the guinea pigs [J]. Shizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2012, 23(1): 56-58.
- [6] ZHANG Y Z, LI X L, MOU G M. Studies on anti-inflammatory and antiallergic effects of CH_2Cl_2 extract of Flos Magnoliae [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 31(9): 811-813.
- [7] ZHANG J, WENG F H. Study the antiallergic medium and anti-acetylcholine effect of Baofei Qumin infusion on the contraction of isolated ileum of guinea pig [J]. J Tianjin Med Univ(天津医科大学学报), 1999, 5(4): 69-70.

收稿日期: 2014-02-25

硝酸镓联合氧氟沙星抑制尿路致病性大肠杆菌生物膜形成

葛新, 邢杰* (武警后勤学院病原生物与免疫学教研室, 天津 300309)

摘要: 目的 观察硝酸镓联合氧氟沙星对尿路致病性大肠杆菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)生物膜形成的抑制作用。方法 采用结晶紫染色法检测 5 株 UPEC 生物膜形成过程, 将 $0.5 \times$ 最低抑菌浓度(MIC)的硝酸镓和氧氟沙星单独应用与联合使用, 计算其对 UPEC 生物膜的抑制率。结果 2 种药物单独应用只能部分抑制生物膜形成, $0.5 \times$ MIC 硝酸镓($4.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和 $0.5 \times$ MIC 氧氟沙星($0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)联合应用对细菌生物膜的抑制率为 94.46%~97.03%, 明显强于 2 种药物单独作用($P < 0.01$)。结论 硝酸镓联合氧氟沙星对 UPEC 生物膜形成有明显抑制作用, 对尿路感染的防治具有进一步应用价值。

关键词: 大肠杆菌; 生物膜; 硝酸镓; 氧氟沙星; 尿路感染

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)11-1330-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.008

Inhibition of Uropathogenic *Escherichia Coli* Biofilm by the Combination of Gallium Nitrate and Ofloxacin

GE Xin, XING Jie* (Department of Pathogenic Biology and Immunology, Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the inhibitory effects of combination of gallium nitrate and ofloxacin on the biofilm formation produced by five strains of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). **METHODS** The crystal violet staining was

基金项目: 武警后勤学院科研基金面上项目(WHM201202)

作者简介: 葛新, 男, 博士, 讲师 Tel: (022)84876726

E-mail: bigxer@163.com

*通信作者: 邢杰, 男, 硕士, 副教授

Tel:

(022)84876725 E-mail: xingjie022@163.com

used to measure the development of UPEC biofilm. The effects of gallium nitrate and ofloxacin on biofilm were evaluated separately or synergistically at 0.5×minimal inhibitory concentration (MIC). **RESULTS** Single use of gallium nitrate or ofloxacin partly inhibited biofilm growth, while 4.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of gallium nitrate combined with 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ofloxacin inhibited UPEC biofilm formation by 94.46%–97.03%, which were better than separate use of gallium nitrate or ofloxacin ($P<0.01$). **CONCLUSION** The combination of gallium nitrate and ofloxacin have obvious inhibitory effects on UPEC biofilm formation, showing the potential application value for prevention and control of urinary tract infection. **KEY WORDS:** *Escherichia coli*; biofilm; gallium nitrate; ofloxacin; urinary tract infection

尿路感染是临床常见病，尿路致病性大肠杆菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)是其主要致病菌^[1]。与引起腹泻的大肠杆菌不同，UPEC具有与尿路感染相关的毒力因子，如黏附结构P菌毛和1型菌毛，细胞毒性物质如溶血素、细胞坏死因子以及载铁体等，这些毒力因子在细胞黏附、杀伤宿主细胞及细菌在泌尿道环境中生存等方面发挥作用。在致病过程中，细菌黏附素能够促使UPEC黏附于导尿管表面或泌尿道上皮细胞形成细菌生物膜，细菌生物膜的形成增加了病原菌对抗菌药物和宿主免疫应答的抵抗力，往往导致感染慢性化。因此，抑制生物膜形成成为泌尿道感染防治的重要研究内容。近年来金属镓离子(Ga^{3+})的抑菌作用受到关注，相继发现其对葡萄球菌、假单胞菌、伯克霍尔德菌等有较强的抑制作用^[2-3]。本研究在此基础上观察 Ga^{3+} 是否可以与氧氟沙星协同作用抑制UPEC形成细菌生物膜的能力，从而为防治尿路感染增添新的内容。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

大肠杆菌W38、W49、W84、W89、W140分离自武警后勤学院附属医院尿路感染患者，在前期研究中经过鉴定并证实为生物膜阳性UPEC菌株^[4]。

1.2 培养基

细菌生物膜培养采用M63基础培养基(北京陆桥公司)，每1 000 mL含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g， KH_2PO_4 13.6 g， $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg，用KOH调pH为7.0，高压灭菌后加入1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mL和20%葡萄糖10 mL。药敏试验采用M-H肉汤培养基。

1.3 试剂与器材

硝酸镓(Sigma-Aldrich公司)；氧氟沙星(天津药典标准仪器药品开发公司)；结晶紫染色液(北京陆桥公司)；96孔细胞培养板(美国Corning公司)；Model 550酶标仪(BIO-RAD)。

1.4 细菌生物膜生长曲线测定

采用结晶紫染色法^[5]。M63基础培养基过夜培

养待测菌株，菌液稀释为 2×10^7 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，取1.25 μL 菌液加入到96孔板中的125 μL M63培养基中，37℃静置培养24 h，按1:100取菌液转移至新孔的125 μL M63培养基中，37℃静置培养，每株菌设4个复孔，分别在4，8，12，16，20，24，28，32，36，40 h结束培养。吸去菌液，用生理盐水清洗游离细菌，每孔加入结晶紫染色液175 μL ，染色1 min后吸去染液，用生理盐水冲洗多余染液，室温放置1 h，待完全干燥后每孔加入二甲基亚砜200 μL ，使与生物膜结合的结晶紫完全溶解，用酶标仪检测吸光度值(A_{550})，结果取平均值。以只含培养基不含细菌的孔为空白对照孔，以时间(h)为横坐标，每株菌每个时间点的吸光度值减去空白对照吸光度值为纵坐标绘制生物膜生长曲线。

1.5 硝酸镓和氧氟沙星最低抑菌浓度(MIC)测定

采用微量肉汤稀释法。各试验菌纯培养接种M-H肉汤培养基，35℃振荡孵育6 h，用无菌生理盐水稀释至0.5麦氏浊度(约 1×10^8 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。硝酸镓和氧氟沙星用M-H肉汤配制成128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液，在96孔板内对倍稀释，使各孔药物由128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 逐步稀释至终浓度为0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。每孔加入试验浓度菌液5 μL 。同时设只含M-H肉汤的孔为空白对照和不含药液的加菌阳性对照。将培养板置于35℃培养24 h，以试验孔中无细菌生长的最低药物浓度为MIC。每种菌重复3次实验。

1.6 UPEC生物膜抑制检测

根据MIC测定结果，选择硝酸镓和氧氟沙星各0.5×MIC为试验药物浓度。按“1.4”项下方法，采用96孔板培养5种UPEC生物膜。试验分4组：硝酸镓组加入终浓度为0.5×MIC的硝酸镓；氧氟沙星组加入终浓度为0.5×MIC的氧氟沙星；联用组加入终浓度各为0.5×MIC的硝酸镓和氧氟沙星；对照组加入等体积生理盐水。各组37℃静置培养32 h，然后染色，检测 A_{550} 吸光度值。生物膜抑制率计算：抑制率=(1-实验组 A_{550} /对照组 A_{550})×100%。试验重复3次，结果取平均值。

1.7 统计方法

使用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析, 采用最小显著差法, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UPEC 生物膜生长曲线

空白对照孔吸光度值在 0.05~0.07 之间。5 株 UPEC 生物膜曲线的趋势基本接近, 可以看出其生长过程分为 3 个阶段, 从开始培养至 12 h 左右为早期, 细菌刚开始定植于孔壁, 处于初始黏附阶段, 此期生物膜 A_{550} 值基本 <0.30 。12~24 h 为生物膜迅速生长期, A_{550} 值持续升高, 最高值位于 0.71~0.84 之间。24~32 h 为成熟期, A_{550} 值继续增加, 但增长趋势已明显放缓, 此阶段的最高 A_{550} 值在 0.99~1.20 之间。32 h 后生物膜生长变化不大, 因此本研究以 32 h 作为 UPEC 菌株的生物膜成熟时间。结果见图 1。

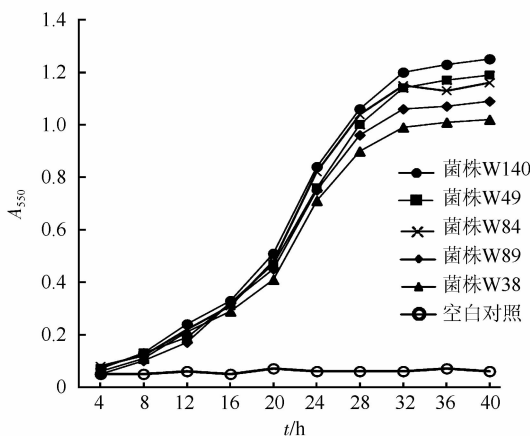


图 1 UPEC 生物膜生长曲线
Fig. 1 Growth curves of UPEC biofilms

2.2 硝酸镓和氧氟沙星的 MIC

硝酸镓和氧氟沙星对游离的 5 株 UPEC 均有很好的抑菌作用, 硝酸镓对试验菌株的 MIC 平均值为 6.67~10.67 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 氧氟沙星 MIC 平均值为 0.42~0.67 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。MIC 见表 1。

表 1 硝酸镓和氧氟沙星对 5 株 UPEC 的最低抑菌浓度
Tab. 1 Inhibitory effects of gallium nitrate and ofloxacin on UPEC strains $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

菌株	硝酸镓 MIC				氧氟沙星 MIC			
	试验 1	试验 2	试验 3	平均值	试验 1	试验 2	试验 3	平均值
W38	8	8	8	8.00	0.5	0.5	0.5	0.50
W49	8	8	4	6.67	1.0	0.5	0.5	0.67
W84	4	8	8	6.67	0.5	0.5	0.25	0.42
W89	8	8	8	8.00	0.5	0.5	0.25	0.42
W140	8	16	8	10.67	0.5	1.0	0.5	0.67

2.3 硝酸镓和氧氟沙星联合应用抑制 UPEC 生物膜

生理盐水对照组细菌生物膜生长未受影响。4.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的硝酸镓和 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氧氟沙星单独使用, 不能完全抑制实验菌株形成生物膜, 其抑制率在 44.31%~62.54%之间。将 2 种药物联合应用, 能显著提高生物膜抑制水平, 对 5 株菌的抑制率在 94.46%~97.03%之间。联合使用组与 2 个单独使用组相比, 抑制率差异有统计学意义 ($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 硝酸镓和氧氟沙星联合对 UPEC 生物膜抑制作用 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Inhibitory effects of combination of gallium nitrate and ofloxacin on the biofilms of UPEC($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

菌株	抑制率/%		
	硝酸镓组	氧氟沙星组	联用组
W38	47.22±6.31	52.24±4.42	96.22±0.63 ¹⁾²⁾
W49	56.03±3.18	62.54±4.24	97.03±1.14 ¹⁾²⁾
W84	44.31±4.03	51.28±6.14	94.46±0.53 ¹⁾²⁾
W89	51.27±5.22	60.24±2.03	95.17±0.34 ¹⁾²⁾
W140	53.81±5.65	55.73±5.92	96.62±0.49 ¹⁾²⁾

注: 与硝酸镓组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与氧氟沙星组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with gallium nitrate group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with ofloxacin group, ²⁾ $P<0.01$.

3 讨论

细菌生物膜作为慢性感染性疾病和医用材料污染的重要原因越来越引人关注。本研究为分析抗菌药物对生物膜的作用, 首先通过测定生物膜生长曲线来确定 UPEC 生物膜的形成过程与成熟时间。与游离细菌生长曲线比较, 生物膜生长曲线的对数生长期不明显, 曲线走势较平缓。此外生物膜内细菌生长时间较长, 本研究中可达 32 h, 而通常游离大肠杆菌培养至 18~24 h 数量就会达到峰值。生物膜的这种生长特性与细菌的群体生长过程有关, 游离细菌首先形成微菌落, 然后微菌落扩张, 内部出现复杂的结构(如营养物质通道)和特殊的密度感应系统标志生物膜成熟^[6]。

由于细菌生物膜一旦形成很难清除, 因此抑制生物膜形成显得尤为重要。然而由于抗菌药物的不良反应、细菌耐药性等问题, 使得单纯依靠抗生素很难从根本上解决问题。因此探索新型细菌生物膜抑制剂成为抗感染领域的重要研究内容。Kaneko 等^[7]发现硝酸镓对铜绿假单胞菌生物膜有明显抑制作用, 其主要机制是镓阻断了细菌的铁代谢。铁是细菌生长以及维持关键酶功能必不可少的元素, 镓离子(Ga^{3+})与 Fe^{3+} 有相似的化学

性质, 因此能够代替 Fe^{3+} 进入多种生物学过程。但是 Ga^{3+} 不能被还原, 因此导致后续的生物学过程中断, 从而抑制细菌生长。

UPEC 的生长也需要铁元素的支持, 尤其是泌尿道本身是一个营养缺乏的环境, 相对于机体其他部位铁含量更少。UPEC 能够通过自身产生的一种小分子量铁螯合物——产气杆菌素从宿主获得铁元素。因此可以推断, 硝酸镓很可能通过阻断 UPEC 对铁的摄入发挥抗菌作用, 进而抑制生物膜的形成。尽管硝酸镓在体外实验中能够表现出良好的抗菌活性, 但也有研究指出, 给志愿者口服 500 mg 镓制剂, 血清药物浓度还达不到有效抑菌浓度^[8]。因此, 本研究采用硝酸镓与氧氟沙星联合应用的方法, 既弥补了抗菌药物抑制生物膜的不足, 又使得镓离子浓度不会太高。实际上由于硝酸镓较高的体外抗菌活性, 更适合于将其融合在生物材料中(例如导尿管壁), 从源头上阻止细菌的定植和黏附。硝酸镓已通过美国食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗高钙血症, 具有很低的组织毒性^[7], 本研究将有助于扩展其临床应用范围。

REFERENCES

- [1] ZHAO L, GAO S, HUAN H, et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between

- uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model [J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 5): 1634-1644.
- [2] PEETERS E, NELIS H J, COENYE T. Resistance of planktonic and biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex isolates to the transition metal gallium [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(5): 1062-1065.
- [3] ZHU Y Y. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by a combination of gallium nitrate and vancomycin [J]. *Mili Med J South Chin*(东南国防医药), 2009, 11(6): 499-501.
- [4] GE X, WANG H, ZHANG X L, et al. Effects of two culture media on the growth of biofilm formed by uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Chin J Infect Chemother*(中国感染与化疗杂志), 2011, 11(3): 195-198.
- [5] WU Y X, GE X, JIN Y, et al. Correlation between biofilm forming ability and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Chin J Infect Control*(中国感染控制杂志), 2011, 10(6): 405-408.
- [6] RASMUSSEN T B, SKINDERSOE M E, BJARNSHOLT T, et al. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium species* [J]. *Microbiology*, 2005, 151(5): 1325-1340.
- [7] KANEKO Y, THOENDEL M, OLAKANMI O, et al. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(4): 877-888.
- [8] BALDONI D, STEINHUBER A, ZIMMERLI W, et al. *In vitro* activity of gallium maltolate against *Staphylococci* in logarithmic, stationary, and biofilm growth phases: comparison of conventional and calorimetric susceptibility testing methods [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(1): 157-163.

收稿日期: 2014-02-05

姜黄素通过调节 miR-21 干预伊马替尼耐药 K562/IM 细胞的化疗敏感性

丁洁卫(绍兴市人民医院, 浙江大学绍兴医院, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 目的 研究姜黄素对伊马替尼耐药的 K562 细胞(K562/IM)多药耐药性的逆转作用, 并探讨其机制。方法 采用 MTT 法分析姜黄素对于 K562/IM 细胞的增殖抑制作用, 并选取非毒性浓度姜黄素联合伊马替尼作用于 K562/IM, 分析其增殖抑制效应;流式细胞术检测其协同诱导细胞凋亡的作用;实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测姜黄素对于 miR-21 和 Bcl-2 蛋白表达水平的改变;并采用 microRNA 转染技术, 观察 miR-21 对细胞增殖抑制和 Bcl-2 蛋白表达的影响。结果 非毒性浓度($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)姜黄素能显著增强 K562/IM 细胞对伊马替尼的敏感性, 并能增强伊马替尼诱导细胞凋亡的作用, 使 K562/IM 细胞平均凋亡率由 6.3%提高到 23.6%($P<0.05$);姜黄素作用后, miR-21 和 Bcl-2 蛋白水平显著降低;miR-21 抑制剂转染 K562/IM 细胞后, 可显著降低 Bcl-2 表达, 提高 K562/IM 细胞对伊马替尼的敏感性。结论 姜黄素可增强 K562/IM 细胞对伊马替尼的敏感性, 并诱导其凋亡, 其作用机制可能与下调 miR-21 表达水平、抑制靶基因 Bcl-2 蛋白表达有关。

关键词: 姜黄素; miR-21; 伊马替尼; K562 细胞; 耐药; 化疗敏感性

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)11-1333-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.009

作者简介: 丁洁卫, 女, 主任药师 Tel: (0575)88228646 E-mail: sxdjw888@163.com