

氨溴索对流感嗜血杆菌生物膜清除和膜内杀菌作用研究

高雪¹ 张玉安¹ 林彦涛² 李海峰³ 辛运超¹ 张晓磊¹ 徐云鹏¹ 尚小颖²

[摘要] 目的:观察氨溴索(AMB)对流感嗜血杆菌生物膜(BF)的作用以及对 BF 菌的杀菌作用。方法:30 株流感嗜血杆菌菌株从腺样体肥大患儿术中切除的腺样体组织分离,选取具有较强成膜能力的 2 株细菌,96 微孔板法培养细菌形成 BF,结晶紫染色法测定不同浓度 AMB 对 2 株细菌 BF 的影响,并用扫描电镜观察细菌 BF 形态结构的改变;平板计数法检测 AMB 对 BF 菌杀菌作用。结果:结晶紫染色法示,当 AMB 浓度分别达到 0.25 mg/ml 和 0.49 mg/ml 时,2 株细菌 BF 吸光度值较对照组差异有统计学意义($P < 0.01$),扫描电镜发现 BF 结构受到破坏;菌落计数显示 AMB 对流感嗜血杆菌 BF 菌有杀菌作用,且剂量依赖效果明显。结论:AMB 在体外对流感嗜血杆菌 BF 具有破坏和清除功能,并对 BF 菌具有杀菌作用。

[关键词] 流感嗜血杆菌;生物膜;氨溴索;杀菌作用

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.10.015

[中图分类号] R714.254 **[文献标志码]** A

Effect of ambroxol on biofilm of *Haemophilus influenzae* and bactericidal action

GAO Xue¹ ZHANG Yutuo¹ LIN Yantao² LI Hai feng³ XIN Yunchao¹
ZHANG Xiaolei¹ XU Yun peng¹ SHANG Xiaoling²

(¹Institute of Pathogen Biology and Immunology, Hebei North University, Zhangjiakou, 075000, China;²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University;³Life Science Research Centre of Hebei North University)
Corresponding author: SHANG Xiaoling, E-mail: xiaolingshang66@sina.com

Abstract Objective: To establish a biofilm model of *Haemophilus influenzae* and observe the effect of ambroxol on biofilm of *Haemophilus influenzae* and bactericidal action. **Method:** Thirty strains of *Haemophilus influenzae* were isolated from adenoids of children with adenoidal hypertrophy. Two strains which could build stronger biofilms was selected in a 96-well plate. The effect of ambroxol on biofilms were determined by crystal violet, and the structure of biofilms were observed by scanning electron microscope (SEM). The numbers of viable bacterial in biofilm after ambroxol treatment determined by plate culture count. **Result:** Through crystal violet assay, significant difference ($P < 0.01$) between the two group after treatment was found when ambroxol concentration reached at 0.25 mg/ml and 0.49 mg/ml. The biofilms was destroyed by SEM. Ambroxol had the positive effect on bacterial killing by plate culture count, and the effect was in a dose dependent. **Conclusion:** Ambroxol could destroy the biofilm of *Haemophilus influenzae*, and had bactericidal function in vitro.

Key words *Haemophilus influenzae*; biofilm; ambroxol; bactericidal action

腺样体肥大是儿童常见的呼吸道疾病,与呼吸睡眠暂停综合征、慢性鼻-鼻窦炎、分泌性中耳炎等^[1-4]疾病关系密切,严重影响儿童的身心健康。国外研究认为细菌在腺样体部位形成生物膜(biofilm, BF)造成反复感染是引起腺样体肥大的重要因素,流感嗜血杆菌是主要的 BF 致病菌^[2]。氨溴索(ambroxol, AMB)是一种呼吸道疾病常用的祛痰剂,临床常用来促进呼吸道黏液的排出,改善呼吸道症状。本研究体外建立流感嗜血杆菌 BF 模

型,观察 AMB 对流感嗜血杆菌 BF 的作用。

1 资料与方法

1.1 材料

菌株:30 株流感嗜血杆菌从腺样体肥大患儿术中离体腺样体组织分离获取,本研究从其中选取具有较强成膜能力的 2 株菌株 HI12 和 HI23,所有临床样本在取样前均未经抗生素治疗。药品:AMB 注射液(爱尔海泰制药,河北,20113063)。培养基和试剂:巧克力培养液(CSM,杭州天和,20130225);脑心浸液培养液(BHI,法国梅里埃,20113135);氯化血红素(Hemin,法国梅里埃,110855);辅酶 I(NAD,法国梅里埃,110844) HTM 培养液(杭州天和,20132222)。仪器和耗

¹河北北方学院病原生物与免疫学研究所(河北张家口,075000)

²河北北方学院附属第一医院耳鼻咽喉-头颈外科

³河北北方学院生命科学中心

通信作者:尚小颖, E-mail: xiaolingshang66@sina.com

材：96 孔细胞培养板(Corning,美国),比浊仪(梅里埃,法国)扫描电镜(日立,日本);CO₂ 孵箱(Thermo,美国)。

1.2 方法

流感嗜血杆菌 BF 半定量实验^[2]:挑取生长在 CSM 培养基上流感嗜血杆菌菌落,加入 BHI 培养液中,35℃,5% CO₂ 过夜培养至 2.0 MCF 浓度,1:10 稀释后加入 96 孔板,每孔 200 μl,阴性对照加入 200 μl BHI,35℃,5% CO₂ 培养 72 h,形成成熟 BF,0.5% 结晶紫染色 15 min,95% 的乙醇脱色,酶标仪 570 nm 读取 A 值。

AMB 对流感嗜血杆菌 BF 的清除作用:将培养 72 h 的长有 BF 的 96 孔板内培养液弃去,分别加入含有 3.750、1.890、0.950、0.490、0.250、0.125 g/L AMB 的培养液 200 μl,阴性对照加入含有等量生理盐水的培养液,24 h 后弃去培养液,0.5% 结晶紫染色 15 min,95% 的乙醇脱色,酶标仪 570 nm 读取 A 值,观察不同浓度 AMB 对流感嗜血杆菌 BF 作用。

SEM 观察 BF 结构:将覆盖有流感嗜血杆菌 BF 的 96 孔板孔底摘除,分别加入含有 3.75、0.49 g/L AMB 的培养液 200 μl,阴性对照加入含有等量生理盐水的培养液,24 h 后将培养液弃去。将附有生物膜的 96 孔板板底摘除,制成 BF 样本。2.5% 戊二醛固定 2 h 后磷酸盐缓冲液缓冲液冲洗 2 遍,然后 30%~100% 乙醇溶液梯度脱水,叔丁醇置换冷冻过夜,真空干燥后离子喷金电镜观察。

AMB 对 BF 菌的杀菌作用:将培养 72 h 的长有 BF 的 96 孔板内培养液弃去,分别加入含有 3.750、1.890、0.950、0.490、0.250、0.125 g/L AMB 的培养液 200 μl,阴性对照加入含有等量生理盐水的培养液,24 h 后弃去培养液,将孔内 BF 转移至含有无菌生理盐水的试管中,均匀震荡后吸取 5 μl 至 HTM 平板做菌落计数。

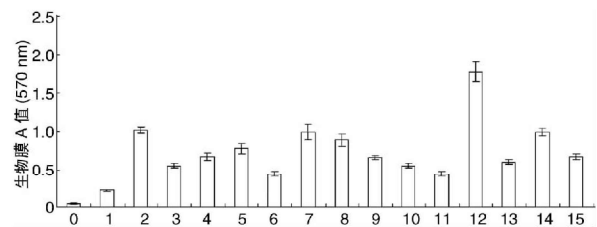
1.3 统计分析

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 流感嗜血杆菌 BF 形成

培养 72 h 后,可见 30 株流感嗜血杆菌 96 孔板内都有 BF 形成,但成膜能力各不相同(图 1),其中,HI12 和 HI23 成膜能力较强。阴性对照组可见成熟 BF 形成,镜下 BF 呈片状分布,立体结构存在;可见流感嗜血杆菌呈短杆状、逗点状等多形性;细菌密度大,相互黏附,有丝状物连接,并可见有交织成网状及小片状的细胞外基质,为 BF 的典型结构(图 2a)。0.49 g/L AMB 处理组可见 BF 细菌之间孔隙变宽,密度减小,立体结构存在于小簇状 BF 中(图 2b)。3.75 g/L AMB 处理组可见立体结构明显减弱或消失,细菌间距变宽,丝状连接减少或者消失,细菌呈单层结构吸附于载体之上(图 2c)。



0: 阴性对照; 1: HI1; 2: HI2; 3: HI3; 4: HI4; 5: HI5; 6: HI6; 7: HI7; 8: HI8; 9: HI9; 10: HI10; 11: HI11; 12: HI12; 13: HI13; 14: HI14; 15: HI15。

图 1 各流感嗜血杆菌成膜能力强弱不同

2.2 AMB 对流感嗜血杆菌 BF 的清除和杀菌作用

实验发现,在培养液 AMB 浓度分别达到 0.25、0.49 g/L 时,2 株流感嗜血杆菌 HI23 和 HI12BF 结晶紫染色 A570 nm 较阴性对照差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),且随着 AMB 浓度的增大,实验组 BF 的 A570 nm 值相应减小(表 1)。AMB 对流感嗜血杆菌 BF 的杀菌作用见平板菌落计数结果(图 3)。

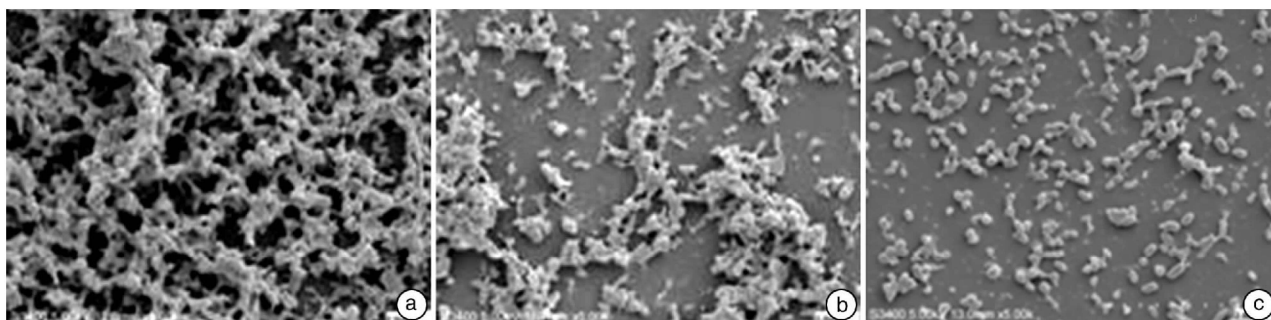


图 2 流感嗜血杆菌 BF 电镜图像 ×5000。

表 1 不同浓度 AMB 对流感嗜血杆菌 BF 结晶紫染色 A570 结果

AMB 浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	HI12	HI23
3.750	$0.50 \pm 0.05^{1)}$	$0.38 \pm 0.06^{1)}$
1.890	$0.58 \pm 0.07^{1)}$	$0.44 \pm 0.08^{1)}$
0.950	$0.63 \pm 0.09^{1)}$	$0.57 \pm 0.07^{1)}$
0.490	$0.75 \pm 0.10^{1)}$	$0.62 \pm 0.06^{1)}$
0.250	1.75 ± 0.18	$0.84 \pm 0.09^{1)}$
0.125	1.89 ± 0.15	1.40 ± 0.12
阴性对照	2.02 ± 0.20	1.58 ± 0.18

与阴性对照相比,¹⁾ $P < 0.01$ 。

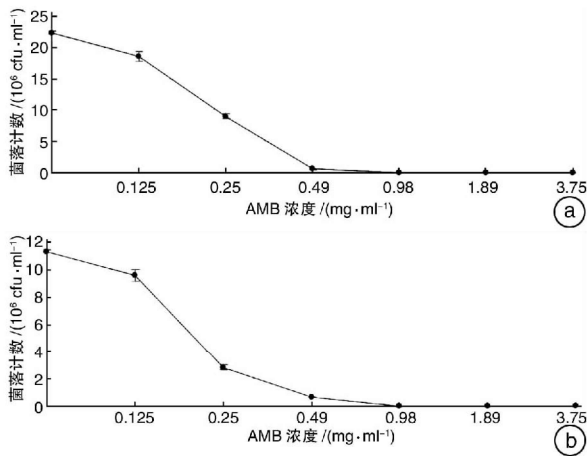


图 3 AMB 对流感嗜血杆菌 BF 菌杀菌作用

3 讨论

流感嗜血杆菌 BF 感染和儿童慢性鼻-鼻窦炎、分泌性中耳炎、腺样体肥大等^[2-3,5]有直接关系。BF 形成后,细菌耐药性可增强 10~1 000 倍,引起临床持续和反复感染。N-乙酰半胱氨酸是一种化痰药,国外研究发现该药物可干扰多种细菌的 BF 形成^[6-7]。AMB 具有和 N-乙酰半胱氨酸类似的化学结构,临床上常用作祛痰剂,用于促进痰液排出,改善呼吸道症状,研究表明 AMB 对表皮葡萄球菌、黏液性铜绿假单胞菌 BF 具有清除破坏作用,并对 BF 菌具有杀菌作用^[8-9]。但 AMB 是否对流感嗜血杆菌 BF 具有类似作用尚未见报导。

本研究中,HI12、HI23 是从腺样体肥大患儿术中切除的腺样体组织分离的 2 株流感嗜血杆菌,均具有较强的成膜能力,且 HI12 大于 HI23。AMB 对 HI12BF 清除作用最低有效浓度为 0.49 g/L,HI23 为 0.25 g/L,可见 AMB 对流感嗜血杆菌 BF 清除作用所需最低有效浓度随细菌成膜能力的高低而不同。SEM 图像显示,AMB 处理组流感嗜血杆菌 BF 厚度变薄,立体结构减弱或消失,细菌之间的孔隙变宽,说明 AMB 能够对流感嗜血杆菌 BF 有破坏和清除作用。BF 是细菌的复合结构,除了各种胞外基质,还包含大量的细菌。实验发现,当

AMB 浓度达到 1.89~3.75 g/L 时,虽然还有一定量 BF 存在,但菌落计数显示,膜内的细菌已经死亡,说明 AMB 除了能清除 BF 外,还有杀菌作用;并且,AMB 对 BF 的杀菌作用有剂量效应,即当 AMB 的浓度达到一定值后,BF 内的活菌数会突然减少或直接变为零。AMB 化痰的机制是 AMB 对痰液中多糖纤维具有分解作用,推测 AMB 对流感嗜血杆菌 BF 清除作用也与对 BF 细胞外多糖的抑制或分解有关,但 AMB 对流感嗜血杆菌的杀菌作用还不明确。

本课题进行的是体外实验,所用 AMB 浓度是由其终浓度依据药敏实验倍比稀释而来,与在实际临床治疗中 AMB 到达腺样体部位的药物浓度是否一致尚可未知,在下一步的实验研究中应加以探讨。

(志谢:本课题在进行过程中得到了海军总医院全军耳鼻喉咽喉头颈外科中心李进让教授的大力支持和悉心指导,在此一并表示衷心的感谢!)

参考文献

- [1] DRAGO L, DE VECCHI E, TORRETTA S, et al. Biofilm formation by bacteria isolated from upper respiratory tract before and after adenotonsillectomy [J]. APMIS, 2012, 120: 410-416.
- [2] GALLI J, CALO L, ARDITO F, et al. Biofilm formation by Haemophilus influenzae isolated from adenotonsil tissue samples, and its role in recurrent adenotonsillitis [J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2007, 27: 134-138.
- [3] 倪坤, 李晓艳. 儿童腺样体肥大并发分泌性中耳炎与变应性鼻炎发病的相关性分析 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012, 26(19): 884-886.
- [4] SAAFAN M E, IBRAHIM W S, TOMOUM M O. Role of adenoid biofilm in chronic otitis media with effusion in children [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2013, 270: 2417-2425.
- [5] COTICCHIA J, ZULIANI G, COLEMAN C, et al. Biofilm surface area in the pediatric nasopharynx; Chronic rhinosinusitis vs obstructive sleep apnea [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 133: 110-114.
- [6] ZHAO T, LIU Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by Pseudomonas aeruginosa [J]. BMC Microbiol, published online. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/140>.
- [7] OLOFSSON A C, HERMANSSON M, ELWING H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 4814-4822.
- [8] 孔晋亮. 氨溴索对铜绿假单胞菌生物被膜作用的体外和体内研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2010.
- [9] 郜向娜, 余加林, 吴玉华, 等. 氨溴索对成熟表皮葡萄球菌生物被膜结构的破坏作用和膜内菌的杀灭作用 [J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(8): 635-639.

(收稿日期: 2013-11-27)