



DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2024.240109

匹维溴铵与苯唑西林联用对表皮葡萄球菌的协同抗菌作用

袁乐宏¹, 余鹏飞²

(1. 中南大学湘雅三医院急诊科, 长沙 410013; 2. 中南大学湘雅三医院检验科, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 表皮葡萄球菌能黏附于医疗器械表面形成高耐药的生物被膜, 针对表皮葡萄球菌及其生物被膜的新型抗菌药物研发已成为研究热点。本研究通过药物重新利用, 探讨L型钙离子通道阻断剂匹维溴铵(pinaverium bromide, PVB)与苯唑西林(oxacillin, OXA)联合使用对表皮葡萄球菌的抗菌作用。方法: 表皮葡萄球菌临床菌株于2022年1至9月收集于中南大学湘雅三医院检验科。通过微量肉汤稀释实验检测PVB和OXA的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。棋盘稀释实验和时间-杀菌曲线用于检测PVB和OXA联用的协同抑菌指数和协同杀菌效率。耐药筛选实验用于检测PVB抑制OXA耐药性形成的能力。生物被膜清除实验结合激光共聚焦显微镜观察和持留菌计数实验用于检测PVB与OXA联用对表皮葡萄球菌高耐药性生物被膜和持留菌的抗菌作用。通过透射电镜、活性氧(reactive oxygen species, ROS)定量实验和ATP定量实验探讨PVB的作用机制。结果: PVB和OXA对表皮葡萄球菌标准菌株RP62A的MIC均为8 μg/mL。棋盘稀释实验显示PVB与OXA联用对表皮葡萄球菌标准菌株RP62A的协同抑菌指数为0.250 0, 对临床分离菌株的协同抑菌指数为0.187 5~0.500 0, 提示均为协同作用。耐药筛选实验发现PVB不仅不会产生耐药, 还能有效抑制OXA产生耐药。1×MIC的PVB和OXA联用时, 可使生物被膜的吸光度($A_{570\text{nm}}$)从(2.36±0.46)减少到(1.12±0.39) ($t=3.504$, $P=0.02$)。通过激光共聚焦显微镜观察可知, PVB和OXA联用还可明显破坏生物被膜的结构, 使死亡细菌的比例增加。同时, 1×MIC的PVB和OXA作用于持留菌4 h, 可使持留菌的总量从lg(7.73±0.21)减少到lg(2.79±0.43) ($t=4.143$, $P=0.014$)。此外, PVB联用OXA的协同抗生物被膜效果在临床菌株中得到进一步验证。透射电镜观察发现PVB可使细菌结构明显破坏。OXA与PVB联用可显著诱导细菌产生ROS, 使ROS相对荧光强度从(30 000.00±2 000.00)升高到(45 666.67±2 081.67) ($t=10.68$, $P<0.001$)。PVB和OXA联用还可显著降低ATP的生成, 使ATP探针相对荧光强度从(565.00±33.18)减少到(205.67±35.23) ($t=4.932$, $P=0.003$)。结论: PVB联用OXA对表皮葡萄球菌及其生物被膜和持留菌具有显著的协同抗菌作用, 有望成为难治性表皮葡萄球菌生物被膜相关感染的替代药物。

[关键词] 匹维溴铵; 苯唑西林; 抗生素; 协同作用; 生物被膜

Synergistic antibacterial effects of pinaverium bromide and oxacillin against *Staphylococcus epidermidis*

YUAN Lehong¹, SHE Pengfei²

收稿日期(Date of reception): 2024-02-27

第一作者(First author): 袁乐宏, Email: yuanlehong9765@csu.edu.cn, ORCID: 0009-0006-1457-6168

通信作者(Corresponding author): 余鹏飞, Email: shepengfei_xy@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-4246-1361

基金项目(Foundation item): 湖南省自然科学基金(2021JJ40944)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province, China (2021JJ40944).

开放获取(Open access): 本文遵循知识共享许可协议, 允许第三方用户按照署名-非商业性使用-禁止演绎4.0(CC BY-NC-ND 4.0)的方式, 在任何媒介以任何形式复制、传播本作品(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)。

(1. Department of Emergency, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013;
2. Department of Laboratory Medicine, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT

Objective: *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) adheres to the surface of medical devices, forming highly drug-resistant biofilms, which has made the development of novel antibacterial agents against *S. epidermidis* and its biofilms a key research focus. By drug repurposing, this study aims to explore the combinational antimicrobial effects between pinaverium bromide (PVB), a *L*-type calcium channel blocker, and oxacillin (OXA) against *S. epidermidis*.

Methods: Clinical isolates of *S. epidermidis* were collected from January to September 2022 at the Department of Clinical Laboratory of the Third Xiangya Hospital, Central South University. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of PVB and OXA were determined using the broth microdilution method. Checkerboard assays and time-kill curves were performed to assess the fractional inhibitory concentration index and synergistic bactericidal efficiency of the drug combination. Resistance selection assays evaluated PVB's ability to inhibit the development of OXA resistance. Biofilm eradication assays, combined with confocal laser scanning microscopy (CLSM) and the persister cell quantification, were conducted to evaluate the effect of PVB and OXA on drug-resistant biofilms and persister cells. The mechanisms of PVB action were further investigated using transmission electronic microscopy (TEM), reactive oxygen species (ROS) quantification, and ATP quantification.

Results: The MICs of PVB and OXA against the standard strain *S. epidermidis* RP62A were both 8 $\mu\text{g/mL}$. Checkerboard assays showed that the fractional inhibitory concentration index (FICI) for the combination was 0.250 0 for RP62A and ranged from 0.187 5 to 0.500 0 for clinical isolates, indicating synergistic effects. Resistance selection assays demonstrated that PVB not only failed to induce resistance but also effectively inhibited the development of OXA resistance. The combination of 1 $\times$ MIC of PVB and OXA reduced biofilm biomass ($A_{570\text{ nm}}$) from (2.36 ± 0.46) to (1.12 ± 0.39) ($t=3.504$, $P=0.02$). CLSM revealed significant biofilm structural disruption and an increased proportion of dead bacteria. Additionally, after 4 hours of treatment, the total persister cell count was reduced from $\lg(7.73\pm0.21)$ to $\lg(2.79\pm0.43)$ ($t=4.143$, $P=0.014$). Synergistic biofilm eradication was further confirmed in clinical isolates. TEM revealed that PVB caused significant bacterial structural damage. The combination of OXA and PVB significantly induced ROS production, increasing the relative fluorescence intensity from $(30\,000.00\pm2\,000.00)$ to $(45\,666.67\pm2\,081.67)$ ($t=10.68$, $P<0.001$), and markedly reduced ATP generation, lowering the relative fluorescence intensity from (565.00 ± 33.18) to (205.67 ± 35.23) ($t=4.932$, $P=0.003$).

Conclusion: The combination of PVB and OXA exhibits significant synergistic antimicrobial activity against *S. epidermidis*, its biofilms, and persister cells. This combination holds promise as a potential alternative therapy for biofilm-associated infections caused by *S. epidermidis*.

KEY WORDS

pinaverium bromide; oxacillin; antibiotics; synergy effect; biofilm

随着抗生素不合理使用的增加,表皮葡萄球菌的耐药性逐年增强。此外,表皮葡萄球菌还能黏附于医疗器械表面而形成高耐药性的生物被膜,给临床诊疗带来极大的困难。表皮葡萄球菌属革兰氏阳性机会致病菌,可在皮肤或呼吸道表面定植,正常情况下是一种能分泌路邓素等保护皮肤组织的正常细菌。然而,当患者免疫力低下或随着侵入性操作进入人体时,表皮葡萄球菌可引起相应的感染性疾病,凝固酶阴性表皮葡萄球菌入血后还可引发菌血症^[1]。常见的感染类型包括导尿管相关感染、人工心脏瓣膜相关感染和人工关节相关感染等。因此,针对表皮葡萄球菌及其生物被膜的新型药物研发已迫在眉睫^[2]。

抗菌药物的研发速度远不及微生物的耐药突变速度,药物重新利用已成为新型抗菌药物的研究热点。Kim等^[3]通过高通量筛选实验发现视黄醇类抗肿瘤药物CD437对金黄色葡萄球菌具有显著的体外和体内杀菌作用。此外,CD437还能有效减少金黄色葡萄球菌持留菌数量,具有重要的临床价值。Zhang等^[4]发现高血压治疗药物非洛地平能有效清除小鼠关节植入钛针上形成的生物被膜,其与庆大霉素联用还具有显著的协同抗菌作用。由于已上市药物具有成熟的合成路线、较为明确的毒理学和药代动力学数据,极大地加快了新药的上市速度,并有效降低了研发成本。

前期研究^[5]利用葡萄球菌属细菌对1 806种美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市药物进行了抗菌活性筛选,发现81种非抗生素药物具有潜在的可重复的抗葡萄球菌属活性,如治疗特发性血小板减少性紫癜药物艾曲波帕能通过破坏细菌的质子动力势能而发挥抗金黄色葡萄球菌活性,同时还发现匹维溴铵(pinaverium bromide, PVB)对葡萄球菌属细菌中的表皮葡萄球菌具有明显的抗菌活性^[5]。PVB是一种用于治疗肠易激综合征的L型钙离子通道阻断剂^[6]。Mao等^[7]报道PVB对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性,但尚未见其与抗生素联用的抗菌效果及对表皮葡萄球菌的抗菌作用和机制的相关报道。本实验室前期研究已对小分子药物进行了高通量初筛,发现PVB联用传统抗生素苯唑西林(oxacillin, OXA)对表皮葡萄球菌具有一定的协同抑菌作用。因此,本研究通过微量肉汤稀释实验、棋盘稀释实验、生物被膜清除实验和时间-杀菌曲线等方法系统地检测PVB与OXA的联合抗菌效果,并进一步通过透射电镜、活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)定量等方法揭示PVB的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯(H2DCFDA)荧光探针、PVB、OXA、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和结晶紫染液均购自美国MedChemExpress公司。Mueller-Hinton(MH)肉汤和胰蛋白胨大豆肉汤(trypitone soy broth, TSB)均购自北京索莱宝科技有限公司。ATP增强型试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。羊血琼脂平板购自郑州安图生物技术有限公司。96孔细胞培养板和50 mL离心管均购自美国康宁公司。全自动麦氏比浊仪购自法国梅里埃公司。恒温摇床、恒温培养箱和-80℃低温冰箱购自美国赛默飞公司。Bio-tek全自动酶标仪均购自美国伯乐公司。透射电镜购自日本日立公司。激光共聚焦显微镜购自德国蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株收集及保存

表皮葡萄球菌标准菌株RP62A购自美国标准菌株收藏中心。表皮葡萄球菌临床菌株SEP101、SEP102、SEP103、SEP104、SEP105、SEP106、SEP107和SEP108均于2022年1至9月收集自中南大学湘雅三医院检验科住院患者的血液标本。细菌经羊血琼脂平板分纯培养,并通过基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱进行鉴定。所有菌株均于甘油磁珠中接种,-80℃保存,在羊血琼脂平板上传代2次后进行后续实验。

1.2.2 微量肉汤稀释实验

挑取羊血琼脂平板上的新鲜菌落于无菌生理盐水中,用麦氏比浊仪调至0.5麦氏浊度(McFarland, McF),再用MH肉汤按1:100稀释后备用。向96孔板中每孔分别加入50 μL用MH肉汤进行倍比稀释至0.031 3~32.000 0 μg/mL PVB和/或OXA,再分别加入50 μL备用菌悬液。DMSO设为阴性对照。将96孔板放置于湿盒中,于37℃恒温孵育箱中静置培养16~18 h。读取最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),即抑制细菌增殖的最低抗菌药物浓度^[8]。

1.2.3 棋盘稀释实验

挑取新鲜菌落于TSB中,于37℃下以180 r/min摇菌培养2~4 h至对数生长期,并用麦氏比浊仪调至0.5 McF,用MH肉汤按1:100稀释后备用。用新鲜MH肉汤将PVB倍比稀释至0.25~16.00 μg/mL,用备用菌悬液将OXA倍比稀释至0.031 3~2.000 0 μg/mL,向96孔板中每孔分别加入50 μL稀释后的PVB和/或OXA。将96孔板轻轻混匀后置于湿盒中,在37℃恒

温孵育箱中静置培养 16~18 h。根据浊度读取联用后的 MIC 值或用酶标仪检测 630 nm 处的吸光度 (absorbance, A), 并计算协同抑菌指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI), 公式为 $FICI = (MIC_{A \text{ 联用 } B} / MIC_{A \text{ 单用}}) + (MIC_{A \text{ 联用 } B} / MIC_{B \text{ 单用}})$ 。FICI ≤ 0.5 为协同作用, 0.5 < FICI ≤ 4 为无关作用, FICI > 4 为拮抗作用^[9]。

1.2.4 时间-杀菌曲线

将对数生长期的表皮葡萄球菌 RP62A 用麦氏比浊仪调至 0.5 McF, 并用 MH 肉汤按 1:100 进行稀释, 向 50 mL 离心管中每管加入 10 mL, 再向各管中分别加入亚抑菌浓度的 PVB、OXA 和 PVB+OXA, 使 PVB 和 OXA 的终浓度分别为 1/4×MIC。将离心管放置于 37 °C 恒温摇床上以 180 r/min 摇菌培养, 并分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 吸取 100 μL 菌悬液进行平板稀释菌落计数。绘制时间-杀菌曲线^[10]。

1.2.5 耐药筛选实验

通过药敏试验检测 PVB 和 OXA 的 MIC, 将 1/2×MIC 孔中的菌悬液和 MH 肉汤按 1:1 000 倍稀释后, 向 96 孔板中每孔加入 50 μL 稀释后菌悬液。再向每孔分别加入 50 μL 用 MH 肉汤分别倍比稀释至 1/16⁻⁸×MIC 的 PVB 和/或 OXA, 轻轻混匀后置于湿盒中, 在 37 °C 下恒温孵育 24 h。记录 MIC 值, 并将 1/2×MIC 孔中的菌悬液按 1:1 000 倍稀释后继续进行 MIC 检测。如此往复监测 15 d, 记录每天的 MIC 值^[11]。

1.2.6 生物被膜清除实验

挑取新鲜菌落于 TSB 中, 于 37 °C 以 180 r/min 摇菌培养 24 h 至平台期。将菌悬液用新鲜 TSB 按 1:200 稀释后, 向 96 孔板中每孔加入 200 μL。于 37 °C 静置孵育 24 h, 使其形成生物被膜。弃去上清, 每孔加入 200 μL 生理盐水, 漂洗 3 次。然后每孔加入 200 μL 用 TSB 稀释后的 PVB 和/或 OXA, 然后于 37 °C 继续孵育 24 h 后弃去上清, 用生理盐水漂洗 3 次后弃上清。每孔再分别加入 200 μL 0.25% (w/v) 结晶紫染液, 于室温下静置孵育 15 min 后弃上清, 用生理盐水漂洗 3 次。待晾干后检测 570 nm 处的 A 值, 即为生物被膜的相对量^[11]。

1.2.7 激光共聚焦显微镜观察生物被膜形态

将培养至对数生长期的表皮葡萄球菌 RP62A 用新鲜 TSB 按 1:200 稀释后, 向 6 孔板中每孔加入 2 mL, 再加入一块 10 mm×10 mm 无菌盖玻片。将 6 孔板置于 37 °C 恒温培养箱中静置孵育 24 h 构建生物被膜。用 PBS 轻轻漂洗 3 次, 以去除未与玻片结合的浮游菌, 每孔再分别加入 1×MIC 浓度的 PVB 和/或 OXA。加有 DMSO 的孔设置为对照。将 6 孔板放置恒温培养箱中于 37 °C 下继续孵育 24 h, 用 PBS 漂洗 3 次后, 向

每块玻片上分别滴加数滴 10 μmol/L 的 SYTO9/PI (体积比 1:1) 混合液。置于 4 °C 下避光孵育 15 min, 用 PBS 漂洗掉多余的荧光染液, 通过激光共聚焦显微镜观察生物被膜的形态结构^[10]。

1.2.8 持留菌计数实验

将 RP62A 摇菌培养至平台期, 用 TSB 按 1:200 稀释后, 向 96 孔板中每孔加入 200 μL, 于 37 °C 下静置孵育 24 h 构建生物被膜。弃去上清, 每孔分别加入 200 μL 含有 100 μg/mL 的万古霉素。于 37 °C 下孵育 4 h 后弃上清, 每孔再分别加入 PVB 或 OXA 或两者联用。分别于 0、1、2、3 和 4 h 用移液器 Tip 头打散生物被膜, 充分混匀后, 吸取 100 μL 进行平板稀释菌落计数^[12]。

1.2.9 透射电镜观察

将表皮葡萄球菌 RP62A 在 TSB 肉汤中培养 2~4 h 至对数生长期, 以 4 000 g 离心 8 min 取沉淀。用 1×PBS (pH=7.4) 洗涤沉淀 2 次后, 加入 5×MIC PVB, 于 37 °C 下摇菌孵育 1 h。再以 4 000 g 离心 8 min 收集沉淀, 加入 1 mL 戊二醛固定样品, 并用 0.1 mol/L 二甲酰二甲酸缓冲液洗涤沉淀。用 1% 四氧化锇/1.5% 亚铁氰化钾固定 1 h 后洗涤, 并在含有 1% 乙酸铀酰的马来酸缓冲液中孵育 1 h。在水中洗涤 2 次后, 用乙醇梯度浓度脱水, 在环氧丙烷中孵育 1 h 后进行包埋, 并在 60 °C 下聚合 48 h。在切片机上切割超薄切片, 收集于铜网格上, 用柠檬酸铅染色。采用透射电镜观察细菌超微结构^[13]。

1.2.10 ROS 定量实验

用 H2DCFDA 探针检测 ROS。将表皮葡萄球菌 RP62A 在 TSB 肉汤中培养 2~4 h 至对数生长期, 洗涤并重悬在 1×PBS 中至 $A_{600 \text{ nm}}=0.5$ 。将细菌悬浮液与 10 μmol/L H2DCFDA 避光孵育 30 min。再用 PBS 洗涤 2 次后, 将 10 μL PVB 或 OXA 或 PVB+OXA 加入 90 μL 制备的细菌悬浮液中孵育 30 min。随后, 在激发波长 488 nm 和检测波长 525 nm 下检测荧光强度^[14]。

1.2.11 ATP 定量实验

将表皮葡萄球菌 RP62A 在 TSB 肉汤中培养 2~4 h 至对数生长期, 洗涤后重悬于 1×PBS 中并调节至 $A_{600 \text{ nm}}=0.5$ 。用 PVB 或 OXA 或 PVB+OXA 处理 1 h 后, 于 4 °C 下以 4 000 g 离心 8 min 取沉淀。分别加入 100 μL 至 96 孔板中, 再分别加入 100 μL 工作液, 采用酶标仪检测荧光强度^[15]。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 统计学软件进行分析。计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组比较采用 Student's *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析

(analysis of variance, ANOVA). $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PVB与OXA联用具有协同抗菌活性

通过微量肉汤稀释实验测得 RP62A 对 PVB 和 OXA 的 MIC 均为 $8 \mu\text{g/mL}$ 。棋盘稀释实验显示 PVB

与 OXA 联用具有明显的协同抗菌作用, 其 FICI 为 0.25(图 1A)。进一步通过时间-杀菌曲线发现 $1/4 \times \text{MIC}$ 的 PVB 或 OXA 对表皮葡萄球菌无杀菌作用或仅有轻微的杀菌作用; 当两药联用时, 可显著减少活菌数量, 作用 12 h 即可完全杀灭表皮葡萄球菌, 且抑制效果长达 24 h(图 1B)。此外, PVB 与 OXA 联用对临床分离菌株均有明显的协同作用, 其 FICI 为 0.187 5~0.500 0(表 1)。

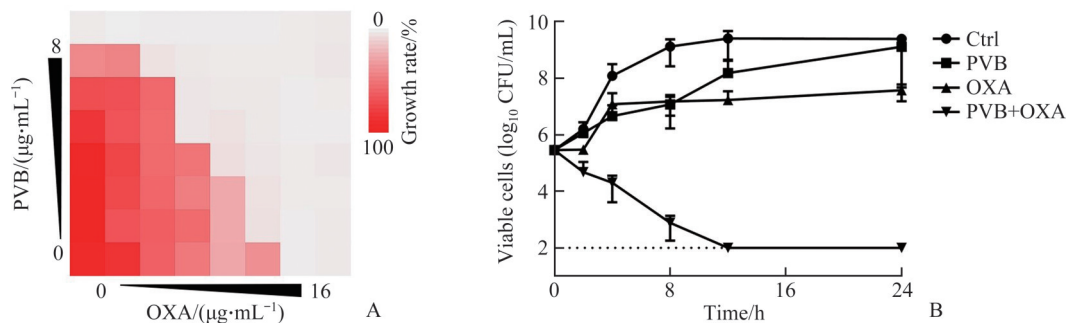


图1 PVB联用OXA对表皮葡萄球菌RP62A的抗菌作用

Figure 1 Antimicrobial effects of PVB combined with OXA against *S. epidermidis* RP62A

A: Antimicrobial effects of PVB combined with OXA determined by checkerboard assay; B: Time-killing assay with $1/4 \times \text{MIC}$ of PVB and OXA alone or in combination. Dash line indicates the limit of detection. PVB: Pinaverium bromide; OXA: Oxacillin; MIC: Minimal inhibitory concentration.

表1 PVB与抗生素联用对表皮葡萄球菌的抗菌作用

Table 1 Effects of PVB combined with antibiotics against *S. epidermidis*

<i>S. epidermidis</i>	Drugs	MIC _{alone}	MIC _{combined}	Fold change	FICI	Outcome
SEP101	PVB	8.000	2.000 0	0.250 0	0.500 0	Synergy
	OXA	0.125	0.031 3	0.250 0		
SEP102	PVB	8.000	2.000 0	0.250 0	0.375 0	Synergy
	OXA	0.250	0.031 3	0.125 0		
SEP103	PVB	8.000	1.000 0	0.125 0	0.187 5	Synergy
	OXA	4.000	0.250 0	0.062 5		
SEP104	PVB	4.000	0.500 0	0.125 0	0.375 0	Synergy
	OXA	0.500	0.125 0	0.250 0		
SEP105	PVB	8.000	1.000 0	0.125 0	0.375 0	Synergy
	OXA	0.125	0.031 3	0.250 0		
SEP106	PVB	8.000	2.000 0	0.250 0	0.500 0	Synergy
	OXA	0.125	0.031 3	0.250 0		
SEP107	PVB	8.000	0.500 0	0.062 5	0.312 5	Synergy
	OXA	0.250	0.062 5	0.250 0		
SEP108	PVB	4.000	1.000 0	0.250 0	0.500 0	Synergy
	OXA	0.125	0.031 3	0.250 0		

SEP101-SEP108 are *S. epidermidis* clinical isolates. A synergistic effect is defined as $\text{FICI} \leq 0.5$; an additive effect is defined as $0.5 < \text{FICI} \leq 1$; an indifference effect is defined as $1 < \text{FICI} \leq 4$; an antagonism effect is defined as $\text{FICI} > 4$. PVB: Pinaverium bromide; OXA: Oxacillin; MIC: Minimal inhibitory concentration; FICI: Fractional inhibitory concentration index.

2.2 PVB抑制OXA耐药的产生

微量肉汤稀释实验测得环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)对RP62A的MIC为0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。亚抑菌浓度CIP连续诱导15 d, 可使CIP的MIC上升64倍。即使亚抑菌浓度的PVB连续诱导15 d, 其对RP62A的MIC始

终维持在8 $\mu\text{g/mL}$ 。亚抑菌浓度的OXA与表皮葡萄球菌作用15 d, 可使其MIC上升16倍, 而当OXA中加入 $1/8\times\text{MIC}$ 的PVB时, 可显著抑制OXA引起的耐药, 使OXA的MIC始终维持在0.5 $\mu\text{g/mL}$ (图2)。

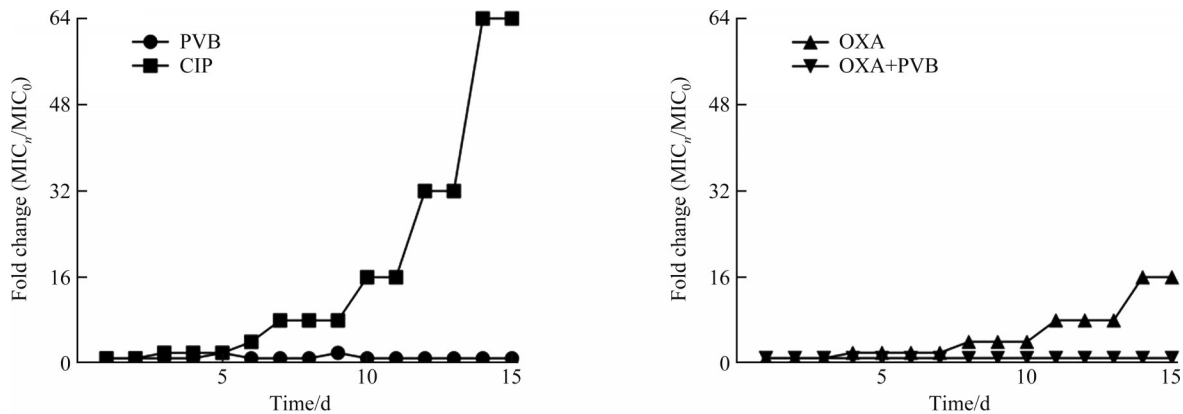


图2 PVB和OXA单用或联用诱导表皮葡萄球菌RP62A耐药检测

Figure 2 Resistance detection with PVB alone and OXA alone or in combination with OXA

CIP is used as a positive control. The concentration of PVB used in the right panel is $1/8\times\text{MIC}$. PVB: Pinaverium bromide; OXA: Oxacillin; CIP: Ciprofloxacin; MIC: Minimal inhibitory concentration.

2.3 PVB促进OXA的生物被膜清除作用和抗持留菌活性

$1/2\times\text{MIC}$ 的PVB或 $1\times\text{MIC}$ OXA对表皮葡萄球菌已形成的生物被膜无清除作用, 而当两者联用时, 可使生物被膜的总量从 (2.36 ± 0.46) 减少到 (1.12 ± 0.39) ($t=3.504$, $P=0.02$; 图3A)。SYTO9/PI荧光染色发现: 用PVB单独处理表皮葡萄球菌生物被膜时仅有微弱的清除作用, 单用OXA时无抗生物膜作用, 而当两者联用时, 可明显降低生物被膜总量, 增加死亡细菌比例(图3B), 即总体弱荧光强度降低(图3C), 红色荧光比例增加(图3D)。PVB和OXA联用还可协同减少生物被膜中的持留菌数量, 且随着作用时间延长, 其抗菌效果更佳。当PVB联用OXA作用于持留菌4 h时, 可使持留菌的总量从 $\lg(7.73\pm 0.21)$ 减少到 $\lg(2.79\pm 0.43)$ ($t=4.143$, $P=0.014$; 图3E)。选取4株临床分离菌株对PVB联用OXA的协同抗生物被膜效果进行验证, 发现单独使用OXA不能或仅轻度清除临

床菌株表皮葡萄球菌生物被膜, 当加入 $1/8\times\text{MIC}$ 的PVB时, 可显著提高OXA对生物被膜的清除能力(图4)。

2.4 PVB的抗菌机制

透射电镜观察发现PVB可明显破坏表皮葡萄球菌正常细胞结构, 使细胞壁坍塌, 细胞内容物外排消失, 且细胞膜聚集成囊泡状(图5A, 5B)。这可能是PVB破坏了细菌能量的产生, 从而无法维持细胞内外渗透压。ROS定量发现: PVB单独使用即可促进ROS的形成, 当OXA与PVB联用时, 则可显著促进细菌产生ROS, 使其相对荧光强度从 $(29\ 966.67\pm 1\ 903.51)$ 升高到 $(45\ 666.67\pm 2\ 081.67)$ ($t=10.420$, $P<0.001$; 图5C)。进一步通过ATP检测发现PVB和OXA联用可显著降低ATP的生成, 使ATP的合成量从 (565 ± 33.18) 减少到 (205.67 ± 35.23) ($t=4.932$, $P=0.003$; 图5D)。因此, PVB联用OXA的抗菌机制可能涉及ROS的产生增多和ATP的合成减少。

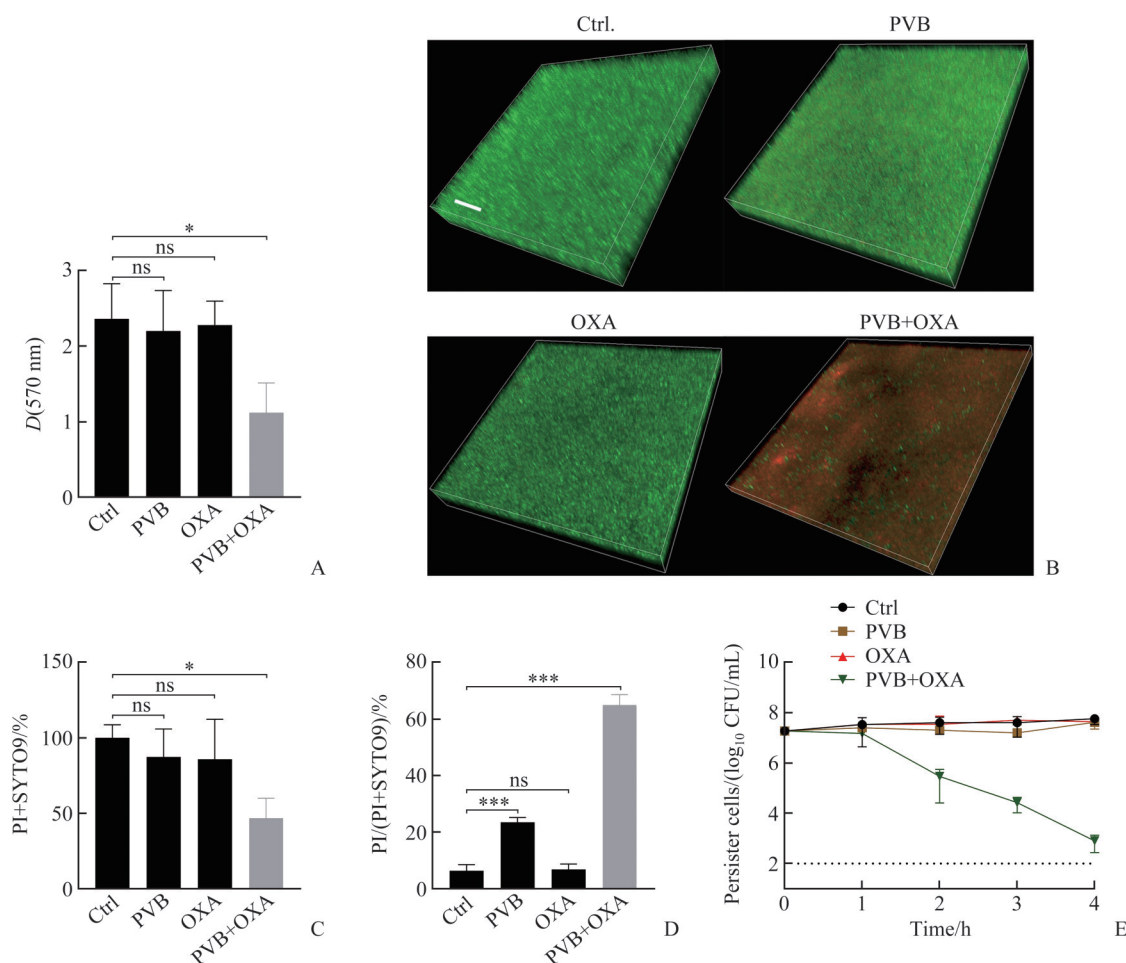


图3 PVB联用OXA对表皮葡萄球菌RP62A生物被膜和持留菌的抗菌作用

Figure 3 Antibiofilm and anti-persister cell effects of PVB combined with OXA against RP62A

A: Biofilm eradication effects of 1/2×MIC PVB and 1×MIC OXA alone or in combination against RP62A by crystal violet staining; B: Biofilm three-dimensional structure observation by SYTO9/PI staining, scale=20 μm; C: Biofilm total biomass quantification by fluorescence intensity analysis; D: Proportion of PI fluorescence intensity; E: Anti-persister cell effects of 1×MIC PVB and 1×MIC OXA alone or in combination. PVB: Pinaverium bromide; OXA: Oxacillin; MIC: Minimal inhibitory concentration; PI: Propidium iodide. ns: No significance, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

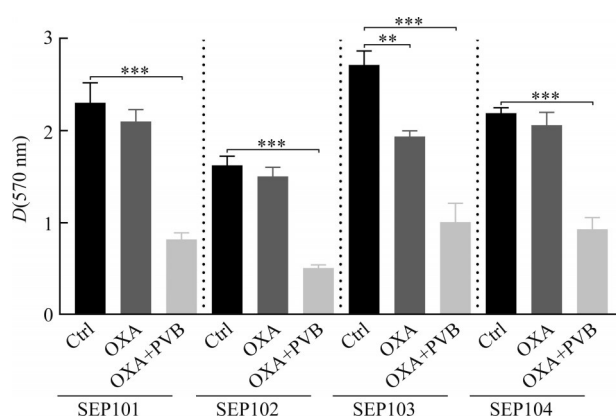


图4 PVB促进OXA对临床菌株生物被膜的清除作用

Figure 4 PVB enhanced the biofilm eradication effects of OXA against clinical isolates

The concentrations of PVB and OXA used are 1/8×MIC and 1×MIC, respectively. PVB: Pinaverium bromide; OXA: Oxacillin; MIC: Minimal inhibitory concentration. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

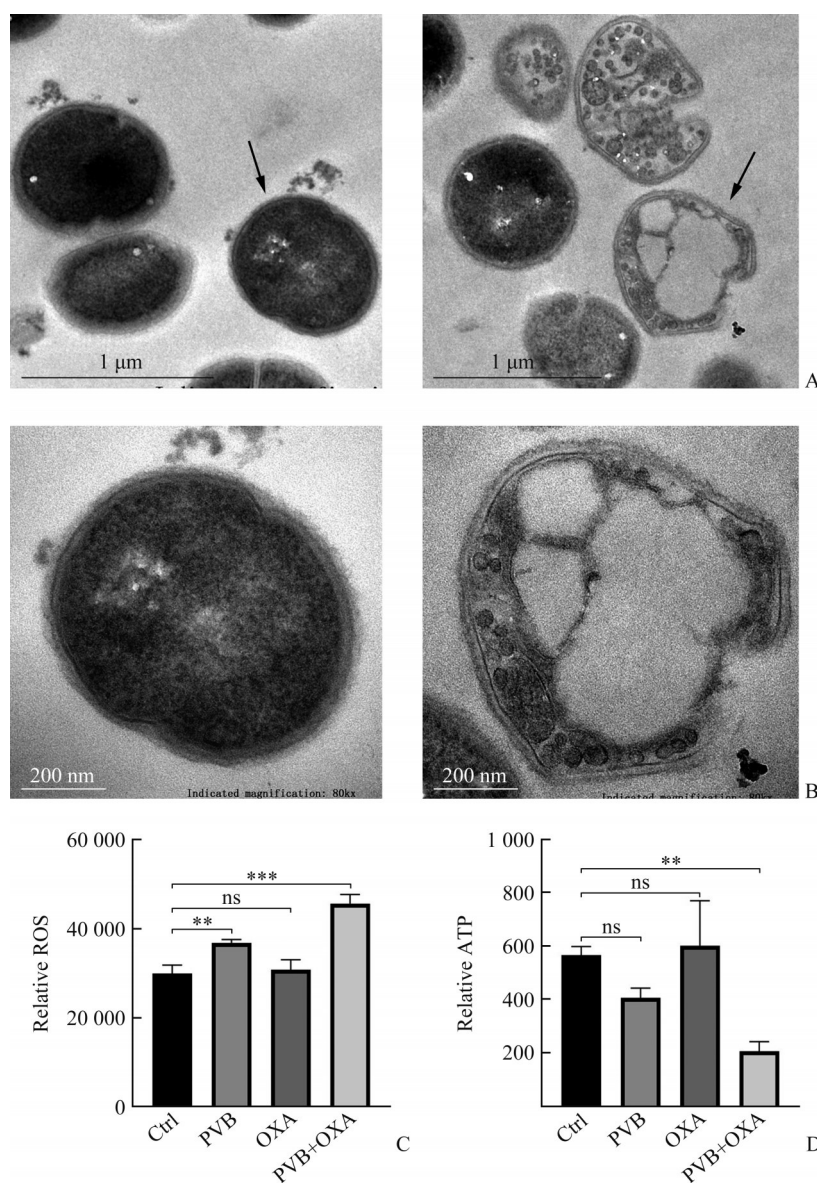


图5 PVB的抗菌机制

Figure 5 Antimicrobial mechanisms of PVB

A: Ultra structure observation of RP62A after treated with 5xMIC of PVB with transmission electron microscope, and the arrows indicated the representative images of single cells. B: Enlarged images of the cells indicated by the arrows. C: ROS quantification after treated with 1xMIC of PVB combined with 1xMIC OXA. D: Intracellular ATP quantification after treated with 1xMIC PVB combined with 1xMIC OXA. PVB: Pinaverium bromide; ROS: Reactive oxygen species; MIC: Minimal inhibitory concentration; OXA: Oxacillin. ns: No significance, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3 讨论

表皮葡萄球菌易黏附于医疗器械表面形成耐药性极高的生物被膜,可随着侵入性操作进入人体而引发感染。目前,尚无有效抗生素能清除已形成的生物被膜。因此,新型抗菌药物的研发已成为当下热点。本研究通过药物重新利用发现治疗肠易激综合征药物PVB联用OXA对表皮葡萄球菌及其生物被

膜和持留菌具有显著的协同抗菌效果,并通过机制实验揭示PVB的作用机制主要涉及ROS的产生。

耐甲氧西林表皮葡萄球菌的流行具有明显的地域区别,欧洲国家占比较高,其表皮葡萄球菌相关感染中,耐甲氧西林分离株占比60%~70%。长时间住院、滥用广谱抗生素或使用多种抗生素、长期抗生素治疗、手术伤口、应用医疗器械、中心静脉置管或使用导尿管等原因都能增加耐甲氧西林表皮葡

萄球菌的发生率^[6]。耐甲氧西林表皮葡萄球菌对 OXA 的耐药性普遍存在^[7]。此外, OXA 可引起肝毒性, 大剂量注射还能导致神经毒性^[8]。因此, 寻找能有效改善 OXA 的抗菌活性并降低其耐药性的佐剂具有较大的临床意义。本研究中, PVB 能有效提高 OXA 的抗菌能力, 并显著改善其耐药形成的能力。因此, PVB 有望成为 OXA 的佐剂, 通过提高 OXA 的抗菌能力降低 OXA 的使用剂量, 从而降低 OXA 的毒性, 提高其使用价值并减弱细菌耐药性, 增强临床实用性。

与本研究类似, Mao 等^[7]发现 PVB 对金黄色葡萄球菌也具有杀菌活性, 其 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 分别为 12.5 μmol/L (约 7.39 μg/mL) 和 25 μmol/L (约 14.79 μg/mL)。本研究测得 PVB 对表皮葡萄球菌的 MIC 为 8 μg/mL, 因此, PVB 对表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌具有相似的抗菌活性。此外, Mao 等^[7]发现 PVB 对金黄色葡萄球菌的生物膜和持留菌也具有一定的抗菌作用, PVB 对金黄色葡萄球菌的抗菌机制主要涉及细胞膜渗透性的破坏, 而本研究对表皮葡萄球菌的抗菌机制主要涉及 ROS 的诱导。

PVB 是一种钙离子通道阻断剂, 毒副作用小且具有良好的人体耐受性。一项研究^[19]通过纳入 117 例消化功能不良的患者, 对比 PVB 和多潘立酮的治疗效果和安全性。结果显示: 治疗 4 周后, PVB 组患者的效果显著优于多潘立酮组, 且不良反应与多潘立酮组差异无统计学意义, 提示 PVB 安全性高。究其原因: 一方面, PVB 的血浆蛋白结合率高, 为 95%~98%, 代谢速度快, 在人体中作用的时间较短; 另一方面, PVB 的全身吸收能力较差, 对胃肠道具有选择性, 而对心血管系统基本无药理作用, 且 PVB 无抗胆碱能作用, 因此对心血管系统无毒副作用^[20-21]。

PVB 的作用机制主要涉及 ATP 的合成减少和 ROS 的产生增多。促进 ROS 产生是诸多抗菌药物共同的作用机制。ROS 主要包括 O^{2•-}、•OH 和过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂), 这些活性成分可以损伤细胞结构中的大分子, 包括蛋白质、脂质和核酸等, 最终导致细菌死亡^[22]。如, 纳米银可通过诱导铜绿假单胞菌产生 ROS 而发挥杀菌作用^[23]; 有氧条件下, 纳米铜可通过诱导 ROS 在周浆间隙中聚集, 从而促进蛋白质凝集而发挥有效抗菌作用^[24]; 衣康酸可通过促进磷酸戊糖代谢途径而产生 ROS, 从而发挥抗炎和抗菌的作用^[25]。此外, 近年来新发现的抗菌药物如羟基查韦斯醇、儿茶素、没食子酸酯和一些酚类等均能通过诱导 ROS 的产生而发挥抗菌作用^[22]。

综上所述, PVB 联用 OXA 对表皮葡萄球菌及其

生物被膜和持留菌均具有显著的协同抗菌作用。PVB 可抑制 ATP 的合成并诱导 ROS 的产生而发挥抗菌活性。PVB 是已上市的肠易激综合征首选治疗药物, 合成路线成熟且毒副作用明确, 有望与 OXA 联用成为难治性表皮葡萄球菌生物被膜相关感染的替代药物。

作者贡献声明: 袁乐宏 数据采集, 论文撰写与修改; 余鹏飞 数据分析, 论文指导、撰写与修改。所有作者阅读并同意最终的文本。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] Ortega-Peña S, Martínez-García S, Rodríguez-Martínez S, et al. Overview of *Staphylococcus epidermidis* cell wall-anchored proteins: potential targets to inhibit biofilm formation[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(1): 771-784. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05139-1>.
- [2] Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, et al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants [J]. J Hosp Infect, 2018, 98(2): 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>.
- [3] Kim W, Zhu WP, Hendricks GL, et al. A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters[J]. Nature, 2018, 556(7699): 103-107. <https://doi.org/10.1038/nature26157>.
- [4] Zhang ST, Qu XH, Jiao JY, et al. Felodipine enhances aminoglycosides efficacy against implant infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, persisters and biofilms[J]. Bioact Mater, 2021, 14: 272-289. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.11.019>.
- [5] She PF, Li SJ, Zhou LY, et al. Repurposing eltrombopag as an antimicrobial agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 790686. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.790686>.
- [6] Bor S, Leher P, Chalbaud A, et al. Efficacy of pinaverium bromide in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. Therap Adv Gastroenterol, 2021, 14: 17562848211033740. <https://doi.org/10.1177/17562848211033740>.
- [7] Mao T, Chai B, Xiong YP, et al. In vitro inhibition of growth, biofilm formation, and persisters of *Staphylococcus aureus* by pinaverium bromide[J]. ACS Omega, 2023, 8(10): 9652-9661. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00340>.
- [8] Taleb MH, Abdeltawab NF, Shamma RN, et al. *Origanum vulgare* L. essential oil as a potential anti-acne topical nanoemulsion—In vitro and in vivo study[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2164. <https://doi.org/10.3390/molecules23092164>.
- [9] Mataraci E, Dosler S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination

- against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(12): 6366-6371. <https://doi.org/10.1128/AAC.01180-12>.
- [10] Li ZH, She PF, Liu YQ, et al. Triple combination of SPR741, clarithromycin, and erythromycin against *Acinetobacter baumannii* and its tolerant phenotype[J]. J Appl Microbiol, 2023, 134(1): lxac023. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac023>.
- [11] Abidi SH, Ahmed K, Kazmi SU. The antibiofilm activity of Acetylsalicylic acid, Mefenamic acid, Acetaminophen against biofilms formed by *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*[J]. J Pak Med Assoc, 2019, 69(10): 1493-1495.
- [12] Shapiro JA, Nguyen VL, Chamberlain NR. Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 7): 950-960. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.026013-0>.
- [13] Liu SS, She PF, Li ZH, et al. Insights into the antimicrobial effects of ceritinib against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo by cell membrane disruption[J]. AMB Express, 2022, 12(1): 150. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01492-w>.
- [14] Song MR, Liu Y, Huang XY, et al. A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens [J]. Nat Microbiol, 2020, 5(8): 1040-1050. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0723-z>.
- [15] Liu Y, Jia YQ, Yang KN, et al. Metformin restores tetracyclines susceptibility against multidrug resistant bacteria[J]. Adv Sci, 2020, 7(12): 1902227. <https://doi.org/10.1002/advs.201902227>.
- [16] Carbon C. MRSA and MRSE: is there an answer? [J]. Clin Microbiol Infect, 2000, 6(Suppl 2): 17-22. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00005.x>.
- [17] You C, Wu ZW, Liao MY, et al. Associated outcomes of different intravenous antibiotics combined with 2% mupirocin ointment in the treatment of pediatric patients with staphylococcal scalded skin syndrome[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2023, 16: 1691-1701. <https://doi.org/10.2147/CCID.S417764>.
- [18] Eljaaly K, Alshehri S, Erstad BL. Systematic review and meta-analysis of the safety of antistaphylococcal penicillins compared to cefazolin[J/OL]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(4): e01816-17[2023-12-20]. <https://doi.org/10.1128/AAC.01816-17>.
- [19] 李玲丽, 刘超, 宋洁, 等. 匹维溴铵片治疗功能性消化不良的效果和安全性研究[J]. 中国现代药物应用, 2022, 16(20): 32-35. <https://doi.org/10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2022.20.008>.
LI Lingli, LIU Chao, SONG Jie, et al. Study on the effect and safety of pinaverium bromide tablets in the treatment of functional dyspepsia[J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2022, 16(20): 32-35. <https://doi.org/10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2022.20.008>.
- [20] Liu QX, Zhu Y, Wang W, et al. Clinical efficacy of cognitive behavioral therapy combined with pinaverium bromide tablets on irritable bowel syndrome[J]. Pak J Med Sci, 2023, 39(4): 1013-1017. <https://doi.org/10.12669/pjms.39.4.6994>.
- [21] Schmulson MJ, Chiu-Ugalde J, Sáez-Ríos A, et al. Efficacy of the combination of pinaverium bromide 100 mg plus simethicone 300 mg in abdominal pain and bloating in irritable bowel syndrome: a randomized, placebo-controlled trial[J/OL]. J Clin Gastroenterol, 2020, 54(4): e30-e39[2024-01-05]. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001242>.
- [22] Aribisala JO, Sabiu S. Redox impact on bacterial macromolecule: a promising avenue for discovery and development of novel antibacterials[J]. Biomolecules, 2022, 12(11): 1545. <https://doi.org/10.3390/biom12111545>.
- [23] Liao SJ, Zhang YP, Pan XH, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 1469-1487. <https://doi.org/10.2147/IJN.S191340>.
- [24] Zuily L, Lahrach N, Fassler R, et al. Copper induces protein aggregation, a toxic process compensated by molecular chaperones[J/OL]. mBio, 2022, 13(2): e0325121[2023-12-01]. <https://doi.org/10.1128/mbio.03251-21>.
- [25] Zhu XY, Guo YY, Liu ZG, et al. Itaconic acid exerts anti-inflammatory and antibacterial effects via promoting pentose phosphate pathway to produce ROS[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 18173. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97352-x>.

(责任编辑 彭敏宁)

本文引用: 袁乐宏, 余鹏飞. 匹维溴铵与苯唑西林联用对表皮葡萄球菌的协同抗菌作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2024, 49(10): 1601-1610. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2024.240109

Cite this article as: YUAN Lehong, SHE Pengfei. Synergistic antibacterial effects of pinaverium bromide and oxacillin against *Staphylococcus epidermidis*[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2024, 49(10): 1601-1610. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2024.240109