

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20245181

· 论 著 ·

胃肠道解痉药匹维溴铵对表皮葡萄球菌的体外和体内抗菌活性研究

彭程^{1,2}, 彭聪², 侯正利¹

(1. 湖南师范大学附属长沙医院检验科, 湖南长沙 410006; 2. 长沙市第四医院检验科, 湖南长沙 410006)

[摘要] **目的** 研究匹维溴铵(PVB)对表皮葡萄球菌(表葡)的体外和体内抗菌活性。**方法** 收集长沙市某医院 2022 年 1—12 月住院患者血液分离的表葡。采用微量肉汤稀释试验和纸片扩散法检测表葡对 PVB 的敏感性, 通过时间—杀菌曲线检测 PVB 抗菌效果的时间和浓度依赖性, 透射电镜观察 PVB 处理后细菌的超微结构改变, 结晶紫染色试验检测 PVB 对表葡生物膜的抑制和清除效果, 采用棋盘稀释法研究 PVB 与抗菌药物的联合抗菌效果。构建皮肤脓肿感染模型, 检测 PVB 的体内抗菌活性。**结果** 药敏试验结果显示, PVB 对表葡标准菌株 RP62A、ATCC 12228 的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)均分别为 8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 对表葡临床菌株的 MIC、MBC 分别为 4~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。纸片扩散法结果显示, 与未加药的对照组(0.60±0) cm 相比, 0.2 mg PVB 出现明显抑菌圈[(2.26±0.09)cm; $t=45.34$, $P<0.001$], 且抑菌圈直径随着 PVB 药量增加而增大。时间—杀菌曲线结果提示, PVB 具有杀菌活性, 且随着药物浓度和作用时间的增加而增强。透射电镜观察发现 PVB 可明显破坏表葡的正常结构, 导致细菌水肿和裂解。此外, $1\times\text{MIC}$ 的 PVB 还可显著抑制表葡生物膜的形成, 使其生物膜的形成量($A_{570\text{nm}}$)从(2.30±0.18)减少到(0.47±0.11; $t=14.85$, $P<0.001$)。同时, $1\times\text{MIC}$ 的 PVB 还可有效破坏已形成的生物膜, 使生物膜的量从(2.64±0.10)减少到(1.77±0.30; $t=4.76$, $P=0.009$)。PVB 与阿米卡星和庆大霉素联用具有协同抗菌活性, 其协同抑菌指数分别为 0.50、0.31。动物模型发现 10 mg/kg 体重的 PVB 可使脓肿面积从(68.83±10.68) mm^2 减少到(35.50±10.58) mm^2 ($t=6.52$, $P<0.001$), 且使脓肿中的活菌量从(6.11±0.55)lg (CFU/脓肿)减少到(3.60±0.34)lg (CFU/脓肿) ($t=3.08$, $P=0.014$)。苏木精—伊红染色发现 PVB 用药组皮肤脓肿中的炎性细胞浸润相比对照组明显减少, 趋于正常。**结论** PVB 对表葡具有明显的体外和体内抗菌活性, 有望成为表葡相关感染的替代治疗途径。

[关键词] 匹维溴铵; 药物再利用; 表皮葡萄球菌; 生物膜; 脓肿感染模型; 抗菌活性

[中图分类号] R378.1[†]1

In vitro and *in vivo* antimicrobial activity of gastrointestinal antispasmodic drug pinaverium bromide against *Staphylococcus epidermidis*

PENG Cheng^{1,2}, PENG Cong², HOU Zheng-li¹ (1. Department of Laboratory Medicine, Changsha Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410006, China; 2. Department of Laboratory Medicine, The Fourth Hospital of Changsha, Changsha 410006, China)

[Abstract] **Objective** To explore the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of pinaverium bromide (PVB) against *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). **Methods** *S. epidermidis* isolated from blood specimens of hospitalized patients in a hospital in Changsha from January to December 2022 were collected. Susceptibility test of *S. epidermidis* to PVB was performed using broth microdilution method and disc diffusion method. The time- and concentration-dependent antimicrobial activity of PVB were determined by time-killing assay. Ultrastructural changes in bacteria after PVB treatment was observed by transmission electron microscope. The inhibitory and clearance effects of PVB on *S. epidermidis* biofilm were detected by crystal violet staining test. The combined antimicrobial

[收稿日期] 2023-11-06

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2023JJ30060)

[作者简介] 彭程(1988-), 女(汉族), 湖南省新化县人, 主管技师, 主要从事微生物检验研究。

[通信作者] 侯正利 E-mail: houzhengli@foxmail.com。

effect of PVB and antimicrobial agents was studied through microdilution checkerboard technique. A skin abscess infection model was constructed to detect the *in vivo* antimicrobial activity of PVB. **Results** Antimicrobial susceptibility testing results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of PVB against the standard strains RP62A and ATCC 12228 were 8 and 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively; The MIC and MBC of clinical strains of *S. epidermidis* were 4–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 8–16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Disc diffusion method results showed that compared with the untreated control group (0.60 \pm 0) cm, 0.2 mg PVB treatment showed a significant inhibitory zone ([2.26 \pm 0.09] cm; $t = 45.34$, $P < 0.001$), and the diameter of inhibitory zone increased with the increase of PVB dosage. The time-killing curves indicated PVB had bactericidal activity, which enhanced with increased concentration and action duration. Transmission electron microscope observed that PVB could significantly damage the normal structure of *S. epidermidis*, leading to bacterial edema and lysis. In addition, at the concentration of $1 \times \text{MIC}$, PVB could significantly inhibit the formation of *S. epidermidis* biofilm, reducing the amount of biofilm formation ($A_{570 \text{ nm}}$) from (2.30 \pm 0.18) to (0.47 \pm 0.11; $t = 14.85$, $P < 0.001$). Meanwhile, PVB at the concentration of $1 \times \text{MIC}$ could effectively destroy the formed biofilm, reducing the amount of biofilm from (2.64 \pm 0.10) to (1.77 \pm 0.30; $t = 4.76$, $P = 0.009$). The combination of PVB with amikacin and gentamicin exhibited synergistic antimicrobial activity, with synergistic inhibitory indexes of 0.50 and 0.31, respectively. Animal models showed that 10 mg/kg body weight of PVB could reduce the area of abscesses from (68.83 \pm 10.68) mm^2 to (35.50 \pm 10.58) mm^2 ($t = 6.52$, $P < 0.001$), and reduce the amount of viable bacteria in abscesses from (6.11 \pm 0.55) lg (CFU/abscess) to (3.60 \pm 0.34) lg (CFU/abscess) ($t = 3.08$, $P = 0.014$). Hematoxylin-eosin staining revealed that the infiltration of inflammatory cells in skin abscesses in the PVB treatment group reduced significantly compared with the control group, tending to be normal. **Conclusion** PVB exhibits effective *in vitro* and *in vivo* antimicrobial effect against *S. epidermidis*, which can be used as an alternative for the treatment of *S. epidermidis*-related infections.

[Key words] pinaverium bromide; drug repurposing; *Staphylococcus epidermidis*; biofilm; abscess infection model; antimicrobial activity

表皮葡萄球菌(表葡)是一种常见的革兰阳性葡萄球菌,常定植于皮肤和呼吸道等组织表面。患者因使用免疫抑制剂、中性粒细胞减少、多重创伤和营养不良等原因导致免疫力低下或发生菌群移位等均可引起表葡的条件性致病^[1],常见的感染类型为血流感染^[2]。表葡还能黏附于医疗器械或人工植入物表面形成生物膜。生物膜是细菌的群体性聚集,具有三维结构,耐药性极高,传统抗菌药物常难以根除已形成的生物膜。导尿管相关感染、关节植入物相关感染和人工起搏器相关感染等均与表葡生物膜的形成有关^[2]。因此,能有效针对表葡生物膜的抗菌药物具有极大的临床价值。

匹维溴铵(pinaverium bromide, PVB)是一种非典型的、对胃肠道具有选择性的L型钙通道阻滞剂。作为治疗肠易激综合征的一线药物,PVB可恢复患者正常胃肠功能,缓解痉挛和疼痛并改善肠道蠕动障碍^[3]。然而,PVB是否具有抗菌活性尚未见报道。氨基糖苷类抗生素是一种广谱杀菌剂,对多种多重耐药的革兰阳性和阴性病原菌均具有抗菌效果。然而,氨基糖苷类药物的肾毒性和耳蜗前庭毒性限制了其在脓毒症和感染性休克中的临床应用^[4]。

前期研究^[5-6]发现,氨基糖苷类抗生素与多种抗菌药物联用具有协同作用,不仅提高了氨基糖苷类抗生素的抗菌效果,还能降低其使用剂量,从而降低毒性。因此,PVB有望成为临床难治性表葡相关感染的替代治疗药物。

本研究旨在通过体外药敏试验、抗生物膜试验和皮肤脓肿感染模型等方法检测PVB对表葡的体外和体内抗菌效果,并通过棋盘稀释试验对传统抗菌药物进行筛选,以探究PVB与氨基糖苷类抗生素的联用效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、PVB、四环素(tetracycline, TET)、红霉素(erythromycin, Ery)、左氧氟沙星(levofloxacin, LEV)、达托霉素(daptomycin, DAP)、磷霉素(fosfomicin, FOS)、利奈唑胺(linezolid, LZD)、万古霉素(vancomycin, VAN)、氨苄西林(ampicillin, AMP)、阿米卡星(amikacin, AMK)、庆大霉素

(gentamycin, GEN)和结晶紫均购自美国 MedChemExpress 公司,所有试剂均溶解于无菌蒸馏水或者 DMSO 储存。PVB 粉末溶解于 DMSO 至 50 mg/mL 保存;Mueller-Hinton (MH)肉汤和 Tryptone Soy Broth (TSB)购自北京索莱宝科技有限公司;MH 平板和羊血琼脂平板购自郑州安图生物有限公司;空白药敏纸片购自湖南比克曼生物科技有限公司;50 mL 离心管和 96 孔细胞培养板购自美国康宁公司;电镜固定液购自武汉谷歌生物科技有限公司;ICR 小鼠购自湖南斯莱克景达动物实验有限公司;恒温摇床购自美国赛默飞公司;HT-7700 透射电镜购自日本日立公司;EXL800 全自动酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司;全自动组织匀浆仪购自武汉谷歌生物科技有限公司;全自动麦氏比浊仪购自法国梅里埃公司。

1.1.2 试验菌株 表葡标准菌株 RP62A 和 ATCC 12228 均购自美国模式菌种收集中心。表葡临床菌株 S. e1、S. e2、S. e3、S. e4、S. e5、S. e6、S. e7、S. e8、S. e9 和 S. e10 均于 2022 年 1—12 月收集自长沙市某医院住院患者的血标本。菌株分离纯化后,通过 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统和基质辅助飞行时间质谱仪进行双重鉴定。所有菌株均接种于甘油磁珠中,−80℃ 保存,并在羊血琼脂平板上连续传代两次后进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 微量肉汤稀释试验 挑取羊血琼脂平板上的纯菌落于无菌生理盐水中,用全自动麦氏比浊仪调至 0.5 麦氏单位(McFarland, McF)。用 MH 肉汤稀释 100 倍后备用。将 PVB 用 MH 肉汤倍比稀释为 0.5~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并向 96 孔板中加入 50 μL /每孔,加入 DMSO 的孔设置为阴性对照组。再向每孔中分别加入 50 μL 备用菌悬液。将 96 孔板放置于湿盒中,37℃ 恒温静置孵育 16~18 h 后判读最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),即通过肉眼判断能抑制细菌生长的最低药物浓度。从 MIC 至最高测试浓度,每孔分别吸取所有培养液于羊血琼脂平板上,37℃ 过夜孵育后,判读最低杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC),即能杀灭 99.9% 的表葡所需的最低药物浓度^[7]。

1.2.2 纸片扩散试验 挑取 RP62A 新鲜菌落于无菌生理盐水中,并调至 0.5 McF。用无菌棉签充分蘸取菌悬液涂布于 MH 琼脂,再次蘸取菌悬液,将平板旋转 60° 后继续涂布 1 遍,一共涂布 3 次。将平板放置室温 15 min,待菌液充分吸收。用无菌镊

子夹取空白药敏纸片轻放于琼脂表面,再分别在空白纸片上滴加 0.2~0.4 mg PVB,并将 0.2 mg VAN 和 DMSO 分别设置为阳性对照组和阴性对照组。将平板放置于湿盒中,37℃ 恒温静置孵育 16~18 h 后,拍照记录,并用游标卡尺量取抑菌圈直径^[8]。

1.2.3 时间—杀菌曲线 挑取 RP62A 新鲜菌落于无菌生理盐水中,调至 0.5 McF,并用 TSB 稀释 100 倍后加入 10~50 mL 离心管中,再向离心管中分别加入 PVB 储存液至 $0.5 \times \text{MIC} \sim 2 \times \text{MIC}$ 。将 DMSO 设置为阴性对照。将离心管放置于 37℃ 恒温摇床上 180 r/min 摇菌培养,并分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 从各组吸取 100 μL 菌悬液进行平板稀释菌落计数,绘制时间—杀菌曲线^[9]。

1.2.4 透射电镜观察细菌超微结构 挑取 RP62A 新鲜菌落,摇菌培养 2~4 h 至对数生长期,5 120 r/min 15 min 离心后取沉淀,用无菌生理盐水漂洗两次,重悬于含有 $5 \times \text{MIC}$ 的 TSB 中,DMSO 设置为阴性对照组。37℃ 180 r/min 摇床培养 1 h 后,收集菌沉淀,并漂洗 3 次。各组加入 1.5 mL 2.5% 戊二醛,4℃ 固定 24 h 后,用 0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液洗涤菌沉淀,并用 1% 四氧化锇进行二次固定。继续用水和马来酸盐缓冲液洗涤,并加入 1% 乙酸铀酰孵育 1 h。随后,将细菌在梯度浓度(30%、50%、70% 和 90%)乙醇中脱水,并包埋在 Spurr 低黏度树脂中。切割超薄切片后,用 2% 乙酸铀酰和柠檬酸铅进行染色,并用透射电镜观察细菌超微结构^[10]。

1.2.5 生物膜抑制和清除试验 生物膜抑制试验:挑取 RP62A 新鲜菌落于适量 TSB 中,37℃ 180 r/min 摇床过夜培养至平台期。将菌悬液用新鲜 TSB 1:200 稀释后,于 96 孔板中每孔加入 100 μL 。用 TSB 将 PVB 储存液稀释至 $2 \times \text{MIC} \sim 8 \times \text{MIC}$,每孔分别加入 100 μL ,并将 DMSO 设置为阴性对照组。将 96 孔板放置于湿盒中,37℃ 恒温静置孵育 24 h 后,弃上清,生理盐水漂洗 3 次,每孔加入 200 μL 0.25% (w/v) 结晶紫染液。室温静置孵育 15 min,弃上清,继续用生理盐水漂洗 3 次去除未与生物膜结合的结晶紫染液,并检测 570 nm 处的吸光度(A)即为生物膜的相对量。生物膜清除试验:将 RP62A 摇床过夜培养后,用 TSB 1:200 稀释并加入 200 μL 至 96 孔板中,37℃ 静置孵育 24 h,弃上清,并用生理盐水漂洗 2 次去除浮游菌。每孔再分别加入 TSB 倍比稀释的 PVB 至 $1 \times \text{MIC} \sim 4 \times \text{MIC}$ 。37℃ 恒温静置孵育 24 h,弃上清,生理盐水漂洗后进行结晶紫染色。其余步骤同上^[8]。

1.2.6 棋盘稀释试验 挑取 RP62A 新鲜菌落, 摇床培养 2~4 h 至对数生长期, 调至 0.5 McF。采用新鲜 MH 肉汤 1:100 稀释备用。将 PVB 用 MH 倍比稀释至 $1/32 \times \text{MIC} \sim 2 \times \text{MIC}$ 后, 于 96 孔板中每横排每孔加入 50 μL , DMSO 设置为阴性对照组。再采用含菌的 MH 肉汤将联用待测的抗菌药物倍比稀释至 $1/32 \times \text{MIC} \sim 2 \times \text{MIC}$, 于每竖排每孔分别加入 50 μL 。混匀后将 96 孔板放入湿盒中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 16~18 h, 酶标仪检测 $A_{630 \text{ nm}}$, 并计算协同抑菌指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI) = $\text{MIC}_{\text{A联用}} / \text{MIC}_{\text{A单用}} + \text{MIC}_{\text{B联用}} / \text{MIC}_{\text{B单用}}$ 。其中, A 和 B 分别为两种联用的抗菌药物。FICI ≤ 0.5 为协同作用, $0.5 < \text{FICI} \leq 4$ 为无关作用, FICI > 4 为拮抗作用^[11]。

1.2.7 皮肤脓肿感染模型 选取 6~8 周龄的雌性 ICR 小鼠进行试验。挑取 RP62A 新鲜单个菌落, 摇床培养 2~4 h 至对数生长期, 收集细菌沉淀并重悬于生理盐水中。用电动剃须刀刮去 ICR 小鼠背部毛发, 并将含有 10^7 CFU 的细菌悬浮液皮下注射到小鼠背部。接种后 2 h, 将受感染的小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只小鼠, 进行单剂量皮下注射治疗 (第 1 组: 含有 DMSO 的生理盐水。第 2 组: 10 mg/kg PVB。第 3 组: 15 mg/kg PVB)。感染 24 h 后测量脓肿面积, 并将感染组织剥离后固定在 4% 多聚甲醛中进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 染色。同时, 切除脓肿组织并在生理盐水中充分匀浆。将匀浆液倍比稀释后进行平板稀释菌落计数^[12]。

本项目已通过中南大学实验动物伦理委员会伦理批准 (伦理审查编号: XMSB-2022-0199)。

1.3 统计学分析 所有试验均独立重复 3 次。应用 GraphPad 8.0 统计学软件进行分析。正态分布的连续变量以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

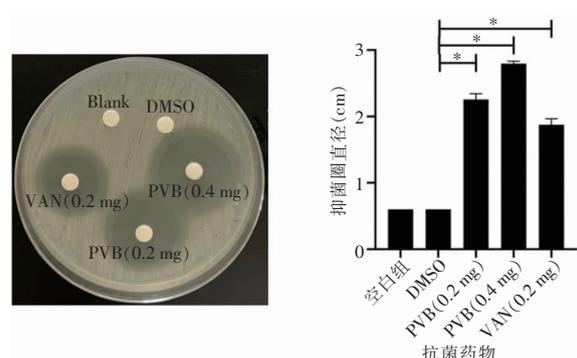
2.1 PVB 对表葡的体外抗菌活性 药敏试验结果显示, PVB 对表葡标准菌株 RP62A、ATCC 12228 的 MIC、MBC 均分别为 8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 对表葡临床菌株也具有相似的抗菌活性, 其 MIC、MBC 分别为 4~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 见表 1。纸片扩散试验结果显示, 与 DMSO 对照组 (0.60 ± 0) cm 相比,

0.2 mg 的 PVB 具有明显的抑菌圈 (2.26 ± 0.09) cm ($t = 45.34$, $P < 0.001$), 且 PVB 的抑菌圈直径 $>$ 相同剂量 VAN 的抑菌圈直径; 随着 PVB 浓度升高, 其抑菌圈直径增大, 见图 1。时间-杀菌曲线也显示 PVB 具有杀菌活性, 且随着药物浓度增加而增强, 并具有一定的时间依赖性, $2 \times \text{MIC}$ 的 PVB 与表葡作用 24 h 可使活菌数量降低至最低检测限值, 见图 2A。此外, 透射电镜显示 PVB 可显著破坏表葡的正常结构, 导致细菌细胞坏死, 早期可见细菌水肿, 晚期可见细菌裂解, 细胞内容物蓬松且有溢出, 见图 2B。

表 1 PVB 对表葡标准菌株和临床菌株的 MIC 和 MBC 结果 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Table 1 MIC and MBC of PVB against standard and clinical strains of *S. epidermidis* ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

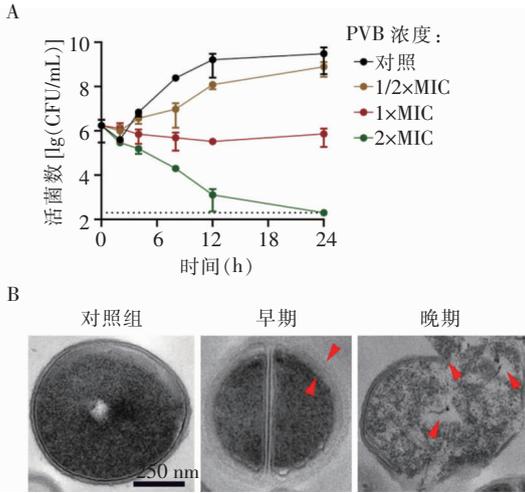
菌株	MIC	MBC
RP62A	8	16
ATCC 12228	8	16
S. e1	8	16
S. e2	8	8
S. e3	4	16
S. e4	8	16
S. e5	8	16
S. e6	8	16
S. e7	4	8
S. e8	4	8
S. e9	8	16
S. e10	8	16



注: * 代表 $P < 0.05$ 。

图 1 纸片扩散法检测表葡对 PVB 的敏感性

Figure 1 Susceptibility of PVB against *S. epidermidis* detected by disc diffusion method



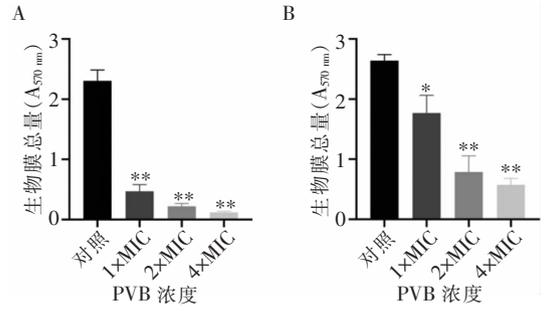
注:红色箭头指示病理改变处。

图 2 PVB 的时间-杀菌曲线(A)和透射电镜结果(B)

Figure 2 Time-killing curve (A) and transmission electron microscope observation (B) of PVB

2.2 PVB 对表葡生物膜的抗菌作用 与对照组相比,1×MIC PVB 处理 24 h 可显著抑制表葡生物膜的形成,其生物膜的形成量($A_{570\text{nm}}$)从(2.30 ± 0.18)减少到(0.47 ± 0.11 ; $t = 14.85$, $P < 0.001$);随着 PVB 的浓度升高,其对生物膜形成的抑制活性增强,具有一定的剂量依赖性,见图 3A。此外,PVB 还能清除表葡已经形成的生物膜。1×MIC PVB 处理已形成的生物膜 24 h 后,表葡生物膜量从(2.64 ± 0.10)减少到(1.77 ± 0.30 ; $t = 4.76$, $P = 0.009$),且随着 PVB 浓度升高,其对表葡生物膜的清除能力显

著增强,见图 3B。

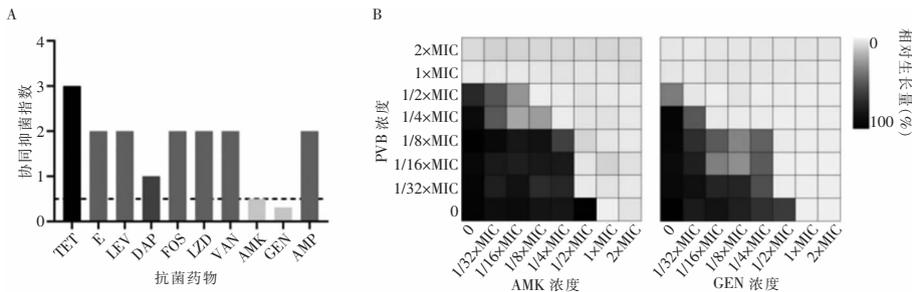


注:A 为 PVB 对表葡生物膜形成的抑制作用;B 为 PVB 对表葡已形成生物膜的清除作用。* 代表与对照组比较 $P < 0.05$, ** 代表与对照组比较 $P < 0.001$ 。

图 3 PVB 抗表葡生物膜检测结果

Figure 3 Detection result of PVB against *S. epidermidis* biofilm

2.3 PVB 与抗菌药物联用的协同抗菌作用 通过棋盘稀释试验初步筛选 PVB 与常用抗菌药物(包括 TET、E、LEV、DAP、FOS、LZD、VAN、AMP、AMK 和 GEN)的联合作用。结果显示,PVB 与 AMK、GEN 联用的 FICI 值最低,分别为 0.50、0.31,提示联用具有协同抗菌作用;PVB 与其他抗菌药物联用均表现为无关作用,其中,与 TET 联用的 FICI 值最高(为 3),与 E、LEV、FOS、LZD、VAN 和 AMP 的 FICI 值均为 2,与 DAP 联用的 FICI 值为 1,见图 4A。亚抑菌浓度的 PVB 和亚抑菌浓度的 AMK 或 GEN 联用可显著抑制表葡的增殖,并降低其生长浊度,见图 4B。



注:A 为 PVB 与不同抗菌药物联用的 FICI 值;B 为 PVB 与 AMK 或 GEN 联用的棋盘稀释试验。

图 4 PVB 与不同抗菌药物联用的抗菌效果

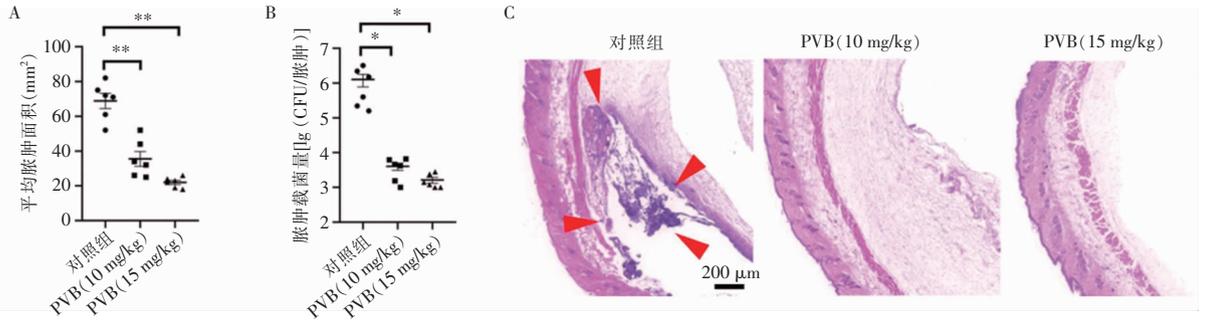
Figure 4 Antimicrobial effect of PVB combined with different antimicrobial agents

2.4 PVB 对表葡的体内抗菌活性 为研究 PVB 对表葡的体内抗菌活性,本研究构建了小鼠皮肤脓肿感染模型。与未加药的对照组相比,10 mg/kg 的 PVB 可使脓肿面积从(68.83 ± 10.68) mm^2 减少到

(35.50 ± 10.58) mm^2 ,脓肿面积显著缩小($t = 6.52$, $P < 0.001$),见图 5A。10 mg/kg 的 PVB 还可显著降低脓肿模型中的细菌载量,与对照组相比,脓肿中的活菌量从(6.11 ± 0.55) $\text{lg}(\text{CFU}/\text{脓肿})$ 减少到

(3.60 ± 0.34)lg (CFU/脓肿) ($t = 3.08$, $P = 0.014$), 见图 5B。H&E 染色显示对照组脓肿中的炎性细胞浸润明显, 而 10 mg/kg 和 15 mg/kg PVB 用药组

的皮肤脓肿中几乎未见到炎性浸润, 皮肤组织呈正常状态, 见图 5C。



注: A 为皮肤脓肿面积; B 为皮肤脓肿细菌载量; C 为 H&E 染色观察脓肿组织中的炎症浸润; 红色箭头所指为脓肿边界; * 代表 $P < 0.05$, ** 代表 $P < 0.001$ 。

图 5 PVB 在皮肤脓肿感染模型中的抗菌作用

Figure 5 Antimicrobial effect of PVB in skin abscess infection model

3 讨论

表葡常黏附于人体组织或医疗器械表面形成生物膜, 随着侵入性操作引起血流感染。生物膜的耐药性高, 常给临床治疗带来极大困难。本研究将肠道解痉药 PVB 重新利用, 发现其对表葡具有显著的体外和体内抗菌效果, 对表葡生物膜也具有良好的抗菌活性。此外, 棋盘稀释试验显示 PVB 与氨基糖苷类抗生素 AMK、GEN 联用具有协同抗菌活性, 联合 PVB 可提高 AMK、GEN 的抗菌效果, 降低其使用剂量, 从而降低其毒性。

抗菌药物的不合理使用导致细菌耐药增加, 而新型抗菌药物的研发速度慢、时间长, 临床抗感染面临的压力与日俱增。近年来, “老药新用” 因研发成本低、效率高和易商品化等原因, 已成为抗菌药物的研发热点。Stokes 等^[13]通过人工智能深度学习, 发现治疗糖尿病药物 halicin 可通过破坏细菌细胞膜内外的质子动力势能发挥抗菌作用。Yu 等^[14]发现抗类风湿药物金诺芬和抗原虫药物喷他脒联合使用对多重耐药革兰阴性杆菌具有协同抗菌作用。本研究中, PVB 作为肠易激综合征一线治疗药物, 对表葡及其生物膜具有明显抗菌活性, 其对表葡的体内抗菌效果也得到证实。此外, 研究^[3]发现 PVB 对黑色素瘤还具有抗肿瘤作用, 其主要机制为: PVB 可作用于核苷酸结合结构域和伴侣蛋白的连接子, 并抑制细胞内热休克蛋白 Hsp70 伴侣蛋白的活性, 从

而诱导肿瘤细胞凋亡。

PVB 抗菌效果显著, 具有杀菌活性, 其 MBC 为 $8 \sim 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。透射电镜观察显示, PVB 可引起细菌水肿, 最终导致细菌裂解, 推测 PVB 可能通过破坏细菌内外渗透压平衡介导抑菌。由于细菌的渗透压主要由细胞内外的质子动力势维持, 因此, PVB 的作用机制可能涉及质子动力势的破坏。质子动力势由电势 ($\Delta\psi$) 和跨膜质子梯度 (ΔpH) 两部分组成。在细菌中, 质子动力势是质子穿过细胞膜的电化学梯度, 对细菌形态结构和正常生理功能的维持 (如 ATP 合成和各种溶质的运输等) 具有重要作用^[15]。抗菌药物联用试验发现 PVB 与氨基糖苷类抗生素 AMK、GEN 联用具有协同抗菌作用。由于氨基糖苷类抗生素带正电荷, 可通过细菌的细胞内外质子动力势能驱动进入细菌细胞内而产生抗菌活性^[16], 这进一步证实了 PVB 对表葡质子动力势的干扰作用。

PVB 的体内耐受性良好, 无明显不良反应, 其作为抗菌药物被重新利用的安全性高, 成药潜力强。PVB 常见的不良反应主要包括恶心、头晕、血压升高和腹部不适, 占比分别为 3.7%、3.2%、2.3%、2.3%。一项多中心随机对照试验纳入 2012—2013 年间的肠易激综合征患者对 PVB 的安全性进行评估, 其中, 218 例试验患者每日给予 PVB 3 次 (50 mg/次), 对照组 209 例患者每日给予 3 次相同剂量的安慰剂, 结果显示接受 PVB 治疗的患者无严重不良反应^[17]。此外, PVB 还具有显著抗炎作用。Chen 等^[18]发现

PVB 能有效降低肺部脂多糖诱导的炎症介质白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 和 CXCL1 的表达,并抑制中性粒细胞的活化而起到抗炎作用。与之类似,本研究表葡感染相关皮肤脓肿模型显示 PVB 处理 24 h 后的皮肤组织中炎症细胞浸润显著减少,进一步证实了 PVB 的抗炎活性。

PVB 对表葡的体外和体内抗菌效果良好,不良反应较少,且具有显著清除和抑制生物膜的能力。因此,其作为抗菌药物重新利用的研发潜力较大,有望成为难治性表葡相关感染的替代治疗措施。为进一步提高其临床适用性并降低其与原有靶点的亲和力,后续可从抗菌药物联用、纳米递药系统和结构优化等方面着手,对 PVB 进行进一步改造,提高其实用价值。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Brown MM, Horswill AR. *Staphylococcus epidermidis*-skin friend or foe?[J]. PLoS Pathog, 2020, 16(11): e1009026.
- [2] Siciliano V, Passerotto RA, Chiuchiarelli M, et al. Difficult-to-treat pathogens: a review on the management of multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis*[J]. Life (Basel), 2023, 13(5): 1126.
- [3] Dublang L, Underhaug J, Flydal MI, et al. Inhibition of the human Hsc70 system by small ligands as a potential anticancer approach[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(12): 2936.
- [4] Thy M, Timsit JF, de Montmollin E. Aminoglycosides for the treatment of severe infection due to resistant Gram-negative pathogens[J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(5): 860.
- [5] Jospe-Kaufman M, Siomin L, Fridman M. The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2020, 30(13): 127218.
- [6] Craig WA. Optimizing aminoglycoside use[J]. Crit Care Clin, 2011, 27(1): 107 - 121.
- [7] Lee H, Lee J, Hwang J, et al. Repurposing eltrombopag for multidrug resistant *Staphylococcus aureus* infections[J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(11): 1372.
- [8] Li YM, She PF, Xu LL, et al. Anti-hepatitis C virus drug simeprevir: a promising antimicrobial agent against MRSA [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106(7): 2689 - 2702.
- [9] Mone NS, Kamble EE, Pardesi KR, et al. Antibacterial and antibiofilm potency of menadione against multidrug-resistant

S. aureus[J]. Curr Microbiol, 2022, 79(9): 282.

- [10] Zhang ST, Qu XH, Tang HZ, et al. Diclofenac resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactams and prevents implant infections[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(13): 2100681.
- [11] 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.
- [12] Yeaman MR, Filler SG, Chaili S, et al. Mechanisms of NDV-3 vaccine efficacy in MRSA skin versus invasive infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(51): E5555 - E5563.
- [13] Stokes JM, Yang K, Swanson K, et al. A deep learning approach to antibiotic discovery[J]. Cell, 2020, 180(4): 688 - 702. e13.
- [14] Yu YX, Zhao HM, Lin JY, et al. Repurposing non-antibiotic drugs auranofin and pentamidine in combination to combat multidrug-resistant Gram-negative bacteria[J]. Int J Antimicrob Agents, 2022, 59(5): 106582.
- [15] She PF, Li YM, Li ZH, et al. Repurposing 9-aminoacridine as an adjuvant enhances the antimicrobial effects of rifampin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(3): e0447422.
- [16] She PF, Li ZH, Li YM, et al. Pixantrone sensitizes Gram-negative pathogens to rifampin[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(6): e0211422.
- [17] Zheng L, Lai YL, Lu WM, et al. Pinaverium reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a multicenter, randomized, controlled trial[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13(7): 1285 - 1292. e1.
- [18] Chen XH, Liu Y, Dolin H, et al. Pinaverium bromide attenuates lipopolysaccharide-induced excessive systemic inflammation via inhibiting neutrophil priming[J]. J Immunol, 2021, 206(8): 1858 - 1865.

(本文编辑:翟若南)

本文引用格式:彭程,彭聪,侯正利.胃肠道解痉药匹维溴铵对表皮葡萄球菌的体外和体内抗菌活性研究[J].中国感染控制杂志,2024,23(9):1077-1083. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20245181.

Cite this article as: PENG Cheng, PENG Cong, HOU Zheng-li. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of gastrointestinal antispasmodic drug pinaverium bromide against *Staphylococcus epidermidis*[J]. Chin J Infect Control, 2024, 23(9): 1077 - 1083. DOI: 10.12138/j.issn.1671 - 9638.20245181.