

论著

文章编号:1000-5404(2014)16-1694-05

## 穿心莲内酯抗金黄色葡萄球菌生物膜作用及其与庆大霉素的协同作用

周薇,沈犁,张燕,张佳星,姜俊如,华子瑜 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

**[摘要]** 目的 研究穿心莲内酯(andrographolide, Andro)抗金黄色葡萄球菌(*staphylococcus aureus*, *S. aureus*)生物膜作用及其与庆大霉素(gentamicin, GEN)的协同作用。方法 选择金黄色葡萄球菌 ATCC25923 以及 2 株临床菌株 CY001 与 CY002 进行研究。比浊法测定 Andro(浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )对 *S. aureus* 各菌株生长的影响;建立 *S. aureus* 生物膜体外模型,分为对照组、Andro 干预组、GEN 干预组以及 Andro 与 GEN 联合干预组,结晶紫染色后,用酶标仪在 600 nm 波长处测定光密度值  $D(600)$  间接观察各组生物膜的形成能力;扫描电镜观察各组生物膜的结构。结果 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Andro 作用下 *S. aureus* 各菌株生长曲线与对照组相比无显著性差异( $P > 0.05$ );除 CY002 由于不形成生物膜,各组间两两比较均无明显差异外( $P > 0.05$ ),CY001 与 ATCC25923 在各干预条件下生物膜均较对照组减少( $P < 0.001$ ),其中 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Andro 对生物膜的抑制作用强于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GEN( $P$  值分别为 0.001,0.003),两者联用时的抗生物膜作用明显增强( $P < 0.05$ )。扫描电镜观察提示各干预条件对 *S. aureus* 生物膜均有抑制作用,以 Andro 与 GEN 联用的抑制作用最为明显。结论 Andro 对 *S. aureus* 无直接杀菌作用,但对 *S. aureus* 生物膜具有良好抑制作用,与 GEN 联合应用,具有协同抗生物膜作用。

**[关键词]** 生物膜;金黄色葡萄球菌;穿心莲内酯;庆大霉素

**[中图分类号]** R282.71;R378.11;R978.12

**[文献标志码]** A

## Effect of andrographolide against *Staphylococcus aureus* biofilm and its synergistic activity with gentamicin

Zhou Wei, Shen Li, Zhang Yan, Zhang Jiaying, Jiang Junru, Hua Ziyu (Department of Neonatology, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, 400014, Chongqing, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of andrographolide (Andro) against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) biofilms and its synergistic activity in combination with gentamicin (GEN). **Methods** Turbidimetric method was used to detect the effect of Andro (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on *S. aureus* growth curve. *S. aureus* ATCC25923 and 2 clinical strains CY001 and CY002 were used for biofilm formation *in vitro*, dividing into a control group, an Andro intervention group, a GEN intervention group and an Andro combined with GEN intervention group. A microplate reader was used to detect the OD600nm values and indirectly observe the biofilm formation ability of each group. Scanning electron microscopy (SEM) was used to directly observe morphology of biofilms treated with different interventions. **Results** Under the action of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Andro, the growth curve of each strain had no difference as compared to the control group ( $P > 0.05$ ). Except for CY002 that could not form biofilm, there was no significant difference between the groups ( $P > 0.05$ ). The biofilms of CY001 and ATCC25923 in each intervention groups were less than those in the control group ( $P < 0.001$ ). The inhibition effect of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Andro was stronger than that of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GEN ( $P = 0.001$ ,  $P =$

**[基金项目]** 国家临床重点专科-新生儿学项目资料[卫办医政函2011(873号)]

**[通信作者]** 华子瑜, E-mail: h\_ziyu@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140618.1742.002.html>(2014-06-18)

0.003), and the inhibitory effect of the combination intervention group was obviously stronger than that of the Andro intervention group and GEN intervention group ( $P < 0.05$ ). Morphology observation under SEM prompted that each intervention condition had inhibitory effect on *S. aureus* biofilm, while the combination intervention group had the strongest effect. **Conclusion** Andro has no significant effect on the growth of *S. aureus*, but has excellent inhibitory effect on the biofilms of *S. aureus*. Moreover, Andro and GEN have synergistic inhibitory effect.

[ **Key words** ] biofilm; *Staphylococcus aureus*; andrographolide; gentamicin

Supported by the Neonatology Project of National Key Clinical Program [2011(873)]. Corresponding author: Hua Ziyu, E-mail: h\_ziyu@163.com

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是一种常见的社区和医院获得性感染的致病菌,随着医学植入材料及抗生素的广泛应用,*S. aureus*的感染率逐年上升,多重耐药*S. aureus*及耐甲氧西林*S. aureus*检出率也不断增高。*S. aureus*的耐药机制非常复杂,主要涉及青霉素结合蛋白PBP2a变异、 $\beta$ -内酰胺酶的产生、主动外排泵出系统过度表达、核糖体靶位改变、细菌生物膜(bacterial biofilm, BF)形成等。其中BF是引起*S. aureus*耐药的一个主要因素<sup>[1]</sup>,有研究表明,生物膜内细菌对抗生素的抵抗力是浮游菌的数百倍甚至上千倍<sup>[2]</sup>。报道显示,由细菌引起的人体感染中至少80%与生物膜形成有关<sup>[3]</sup>,93.5%的慢性难治性创面检测出*S. aureus*感染<sup>[4]</sup>。因此,寻找防治生物膜相关感染的有效药物更显重要。据报道,提炼于植物穿心莲的有效成分——穿心莲内酯(Andrographolide, Andro)具有解热、抗炎、抗病毒、保肝利胆、免疫调节、抗肿瘤等多种药理作用<sup>[5-8]</sup>。临床上早已广泛应用穿心莲内酯治疗许多慢性感染性疾病<sup>[9-10]</sup>,其对*S. aureus*感染是否同样有效,抗感染机制是否与其抗生物膜作用有关<sup>[11]</sup>,值得探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 药物 穿心莲内酯、庆大霉素(均购于Sigma公司)。

1.1.2 菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC25923、CY001、CY002,以上菌株均由第三军医大学基础医学部微生物学教研室提供,其中CY001、CY002分别来源于同一个化脓性髋关节炎患儿的静脉血与关节液<sup>[12]</sup>,CY002不形成生物被膜,故作为本实验中的对照。

1.1.3 培养基 LB培养基(Fisher Scientific公司)。

1.1.4 试剂 pH7.4磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solutions, PBS),二甲基亚砜(DMSO, Sigma公司)。

1.1.5 检测仪器 酶标仪(BIO-RAD550, 美国),紫外分光光度计(Perkin Elmer Lambda Bio 40, 美国),扫描电镜(HITA-

CHI S-3000N)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 穿心莲内酯对细菌生长的影响 取各冻存菌接种于LB培养板,挑取单菌落于5mL LB培养液过夜培养(37℃, 200 r/min)后用新鲜的LB培养液以1:1 000稀释后分为干预组和对照组,分别加穿心莲内酯(溶剂为二甲基亚砜,终浓度100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和等量二甲基亚砜。放入恒温摇床(37℃, 200 r/min)培养。在不同时间点(0、1、3、5、7、9、11、15、19、22、25、30、35、40、45 h)取菌液标本(每个菌重复取3次标本),在600 nm波长下测光密度值 $D(600)$ ,每个标本重复测量3次,以时间为横坐标,菌液吸光度为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.2 建立金黄色葡萄球菌生物膜体外模型 分别挑取单菌落于5 mL LB培养液中,37℃, 200 r/min,培养至稳定期。用LB培养液将各菌液 $D(600)$ 值调至0.5,取100  $\mu\text{L}$ 入96孔板,平行做3个复孔,并用LB培养液作为空白对照,放入37℃恒温培养箱中培养,隔日换液。培养至需要时间点(1、2、3、4、5、6、7 d),分别取出96孔板,洗去浮游菌,结晶紫染色后,在600 nm波长下测光密度值 $D(600)$ 。

1.2.3 测定各干预条件对金黄色葡萄球菌生物膜的影响 将培养至稳定期的各菌液 $D(600)$ 值调至0.5,分别加入96孔板中(100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ),分为4组,对照组(Control)每孔加入10  $\mu\text{L}$  DMSO,穿心莲内酯干预组(Andro)加入10  $\mu\text{L}$ 穿心莲内酯(终浓度为100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),庆大霉素干预组(GEN)加入10  $\mu\text{L}$ 庆大霉素(终浓度为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),穿心莲内酯与庆大霉素联合干预组(Andro + GEN)则加入10  $\mu\text{L}$ 两者的混合液(各5  $\mu\text{L}$ )。平行做3个复孔,设立空白对照(只加LB培养液),放入37℃恒温培养箱中培养,隔日换液。培养至生物膜稳定期(第3天),取出96孔板,洗去浮游菌,结晶紫染色后在600 nm波长下测光密度值 $D(600)$ 。

1.2.4 扫描电镜观察各干预条件对金黄色葡萄球菌生物膜形态的影响 选择金黄色葡萄球菌标准菌株ATCC25923,建立其生物膜的各组模型(方法同1.2.2),在培养液底部放入已灭菌盖玻片作为生物膜生长的载体,培养至生物膜稳定期(第3天),取出盖玻片,扫描电镜下观察生物膜形态。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行单因素方差分析,其中生

长曲线用双因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 穿心莲内酯对金黄色葡萄球菌生长的影响

结果见图1,金黄色葡萄球菌各菌株均在22 h左右生长达到峰值,此后趋于下降。在100 μg/mL穿心莲内酯的作用下,*S. aureus*各菌株生长曲线与对照组相比无差异( $P > 0.05, n = 3$ ),其中CY001组( $P = 0.481$ );CY002组( $P = 0.479$ );ATCC25923组( $P = 0.486$ ),即100 μg/mL穿心莲内酯对*S. aureus*的生长无明显影响。

### 2.2 金黄色葡萄球菌生物膜生长曲线

从第1~7天,CY002的光密度无明显变化,说明CY002基本不形成生物膜;其他菌株从第1天起光密度迅速升高,到第3天到达顶峰,此后逐渐下降,说明从第0~1天是生物膜的黏附期,细菌通过表面的黏附素蛋白黏附于载体上;第1~3天是生物膜的发展期,在这个时期,细菌分泌大量的胞外多糖黏结单个细菌形成细菌团块,即微菌落,大量微菌落使BF逐渐加厚形成高度有组织的结构,到第3天形成成熟的生物膜,即到达成熟期,此后生物膜趋于消散(图2)。

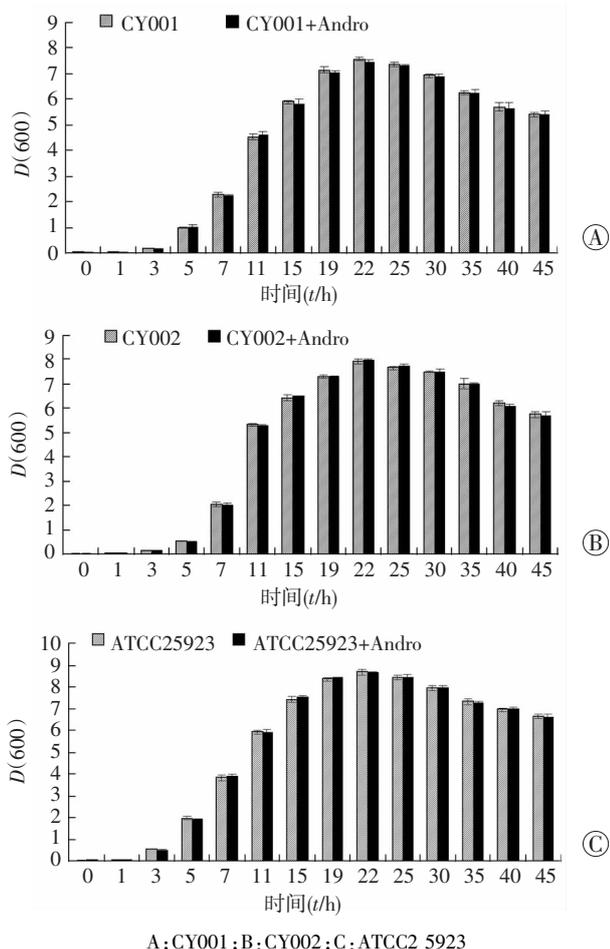


图1 100 μg/mL穿心莲内酯作用不同时间的金黄色葡萄球菌生长曲线

### 2.3 各干预条件对金黄色葡萄球菌生物膜的影响

CY002不形成生物膜,故将其作为对照,可见各干预条件对其生物膜的形成均无影响( $P > 0.05$ ,图3)。CY001与ATCC25923在各干预条件生物膜均较对照组减少( $P < 0.001$ ),其中100 μg/mL穿心莲内酯对生物膜的抑制作用强于50 μg/mL的庆大霉素( $P = 0.001, P = 0.003$ ),两者联用时的抗生物膜作用显著强于它们分别单用( $P < 0.05$ )。说明穿心莲内酯对*S. aureus*生物膜具有明显抑制作用,与庆大霉素联合应用,具有协同抗生物膜作用。

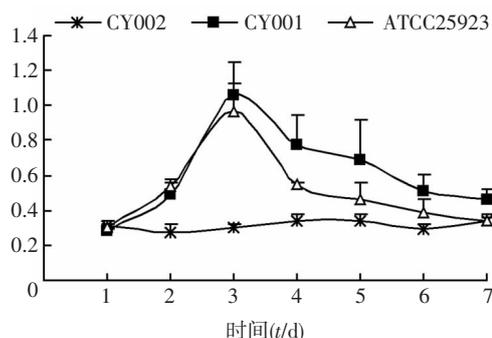


图2 金黄色葡萄球菌生物膜生长曲线

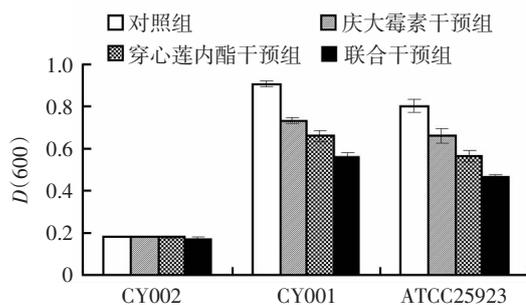
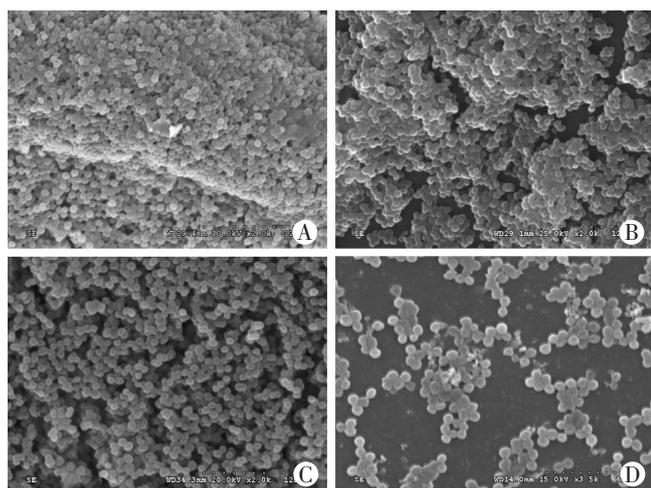


图3 各干预条件第3天对金黄色葡萄球菌生物膜的影响

### 2.4 扫描电镜观察各干预条件对金黄色葡萄球菌生物膜的影响

对照组载体表面细菌聚集在一起,被粘液样物质包裹,形成浓厚云雾状生物膜(图4A);庆大霉素干预组载体表面菌落粘附成团,形成团块状生物膜,各团块相互独立未连接成片,与对照组相比,生物膜稍显稀薄(图4B);穿心莲内酯干预组菌体表面纤维连接结构的形成和粘液的分泌明显减少,细菌分布稀疏,菌体清晰可见,生物膜立体结构不明显(图4C);联合干预组仅见少量散在的细菌粘附于载体表面,无黏液样物质产生,未见明显生物膜结构(图4D)。本结果提示,穿心莲内酯对*S. aureus*生物膜具有良好抑制作用,且与庆大霉素有协同抗生物膜作用。



A: 对照组; B: 庆大霉素干预组; C: 穿心莲内酯干预组; D: 联合干预组

图4 扫描电镜观察各干预条件对金黄色葡萄球菌生物膜形态的影响 (×2 000)

### 3 讨论

细菌生物膜也称生物被膜 (biofilm, BF), 是细菌在生长过程中为适应环境, 附着于机体组织或生物材料表面, 由自身产生的胞外基质包裹的具有一定结构和功能的细菌群体。生物膜这种生存方式可以帮助细菌抵抗多种不利因素, 如大量氧自由基, 过酸或过碱的环境, 被宿主免疫细胞吞噬等, 并使细菌的耐药性显著增强<sup>[13]</sup>, 感染灶难以被有效清除, 且生物膜内的细菌还可不断生长并释放入血, 造成慢性感染和抗生素停用后复发感染, 导致疾病迁延不愈。*S. aureus* 是一种分布广泛的革兰阳性细菌, 常存在于人体前鼻腔。据统计, 有 20% ~ 25% 人群是 *S. aureus* 的长期宿主, 75% ~ 80% 人群是间歇性宿主<sup>[14]</sup>。*S. aureus* 生物膜具有高度的耐药性并能逃避宿主免疫系统的攻击, 是导致慢性骨髓炎、体内植入物生物膜病等慢性难治性疾病的常见原因<sup>[15]</sup>。

鉴于 *S. aureus* 生物膜的这些特点, 如何积极有效地控制其形成具有重要意义。目前临床上抗生物膜的预防措施主要为体内植入物的抗菌预处理或生物材料的表面改性, 即用抗菌剂包被生物材料使其表面改性, 以阻止菌细胞的黏附而减少生物膜的形成, 同时也可直接通过生物材料表面药物的释放来抑制其活性。抗生物膜的治疗措施则侧重于不断研发新的抗菌西药, 如新一代棘白菌素类抗真菌药米卡芬净通过抑制真菌细胞壁主要组分 B-(1,3)-D-葡聚糖的合成而发挥抗白念珠菌生物膜作用, 或探索联合用药来干预生物膜, 主要是抗生素-抗生素联合治疗, 如唑类化合物

SEQ-914 与庆大霉素联用可导致生物膜菌的 CFU/mL 减少 1log; 甾体酰胺 anprocide 与杆菌肽联用能显著抑制小鼠体表 *S. aureus* 生物膜感染; 替加环素与庆大霉素联用、达托霉素与莫西沙星或克拉霉素联用都对 *S. aureus* 生物膜有一定的抑制作用<sup>[16-19]</sup>。然而, 鉴于生物膜的结构与功能特点, 植入物的预防性处理以及单一药物的治疗很难将其彻底清除, 而抗生素联合治疗的抗生物膜效果虽好却往往会加剧 *S. aureus* 耐药菌株的产生, 并增强人体毒副作用。穿心莲内酯作为天然植物药穿心莲的主要有效成分, 具有药效长、来源广、价格低廉、毒副作用小, 较少出现耐药等优点。庆大霉素, 是一种广谱氨基糖苷类抗生素, 它能与细菌核糖体 30s 亚基结合, 阻断蛋白质合成, 使细菌细胞膜通透性增强, 导致细胞内重要物质外漏引起细菌死亡, 从而发挥抗菌作用, 广泛应用于临床。本研究选用临床分离株 CY001、CY002 以及标准株 ATCC25923 作为实验菌株, 其中 CY001、CY002 分别来源于同一个化脓性髓关节炎患儿的静脉血与关节液, 且 CY002 不形成生物被膜, 故作为本实验中的对照。采用间接测定和直接观察的方法, 初步研究了中药穿心莲内酯与西药庆大霉素单用及联用对 *S. aureus* 生物膜的作用。

通过测定 *S. aureus* 生长曲线, 发现穿心莲内酯对 *S. aureus* 各菌株的生长均无明显影响, 说明 Andro 的临床疗效并非通过直接杀菌作用实现, 推测是通过抑制生物膜形成而发挥其抗感染作用, 而接下来的生物膜干预实验证实 Andro 的确能够抑制 *S. aureus* 生物膜的形成。研究表明, GEN 也有一定的抗生物膜作用, 但较弱, 将其与 Andro 联用, 抗生物膜作用显著增强, 说明 Andro 与 GEN 具有协同抗生物膜作用, 其机制可能有: (1) 通过某种途径使 *S. aureus* 生物膜形成初始阶段的关键基因 *ica* 操纵子表达下调, 抑制细胞间多糖黏附素 (polysaccharide intercellular adhesion, PIA) 的分泌, 使得 *S. aureus* 黏附受阻, 无法相互聚集形成微菌落及生物膜结构, 从而增加药物的渗透性, 增强其抗生物膜活性; (2) 通过某种信号转导系统阻遏其 QS-agr 系统 (Agr-like quorum sensing system), 影响生物膜形成相关蛋白的表达, 从而抑制 *S. aureus* 生物膜的成熟, 使得药物更易渗透; 扫描电镜结果也提示, 从对照组, 到庆大霉素干预、穿心莲内酯干预及联合干预组, 菌体表面的纤维连接结构与黏液样物质逐渐减少至几乎没有, 各组 *S. aureus* 的状态由浓厚云雾状变为团块状生物膜, 再到立体结构不明显的稀薄生物膜, 最后仅为散在菌体, 无生物膜结构; (3) 有研究表明<sup>[20]</sup>, Andro 能

够降低铜绿假单胞菌内 *mexAB-OprM* 外排泵的表达水平,减少抗生素的流出,增加抗生素在细胞内的浓度,由此恢复铜绿假单胞菌对抗生素的敏感性。那么,Andro 能否通过降低 *S. aureus* 的 NorA 外排泵的表达以减少 GEN 的流出,增加 GEN 在细胞内的浓度,从而增强其抗生物膜作用,值得探讨。

研究表明,Andro 虽无明显抗菌活性,却能够抑制 *S. aureus* 产生细胞间黏液样物质,阻碍其聚集形成微菌落,抑制生物膜的形成,是良好的生物膜抑制剂。其与庆大霉素联用的协同抗生物膜作用,不仅可以通过干扰细菌群体感应系统减少生物膜的形成,从而降低细菌耐药性,提升抗生素效能,还可减少细菌分泌毒性因子,降低其对人体的损害作用,并能减弱细菌的抗免疫功能,显示出突出的减毒增效优势,具有广阔的应用前景,也丰富了我们抗生物膜的手段,对于临床上难治性感染的治疗具有重要的意义。然而,目前我们的研究仅限于表面效应的观察上,尚缺乏作用机制的探索,且体外实验与体内环境有一定差异,建立动物体内生物膜感染模型则会更加贴近临床,这将是我们的下一步努力的方向。

志谢 衷心感谢第三军医大学基础医学部微生物学教研室为本研究提供的大力帮助

### 参考文献:

[1] Brady R A, OMay G A, Leid J G, *et al.* Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment[J]. *Infect Immun*, 2011, 79(4): 1797-1803.

[2] Hoffman L R, D'Argenio D A, MacCoss M J, *et al.* Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation[J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1171-1175.

[3] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(2): 114-122.

[4] Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jensen P O, *et al.* Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis[J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16(1): 2-10.

[5] Mishra K, Dash A P, Dey N. Andrographolide: a novel antimalarial diterpene lactone compound from *andrographis paniculata* and its interaction with curcumin and artesunate[J]. *J Trop Med*, 2011, 2011: 579518.

[6] Subramanian R, Asmawi M Z, Sadikun A. *In vitro* alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide[J]. *Acta Biochim Pol*, 2008, 55(2): 391-398.

[7] Hidalgo M A, Romero A, Figueroa J, *et al.* Andrographolide interferes with binding of nuclear factor-kappaB to DNA in HL-60-derived neutrophilic cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 144(5): 680-686.

[8] Han Y, Bu L M, Ji X, *et al.* Modulation of multidrug resistance by andrographolide in a HCT-8/5-FU multidrug-resistant colorectal cancer cell line[J]. *Chin J Dig Dis*, 2005, 6(2): 82-86.

[9] Abu-Ghefreh A A, Canatan H, Ezeamuzie C I. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of andrographolide[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(3): 313-318.

[10] Shao Z J, Zheng X W, Feng T, *et al.* Andrographolide exerted its antimicrobial effects by upregulation of human  $\beta$ -defensin-2 induced through p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathway in human lung epithelial cells[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(5): 647-653.

[11] Zeng X, Liu X, Bian J, *et al.* Synergistic effect of 14-alpha-lipoyl andrographolide and various antibiotics on the formation of biofilms and production of exopolysaccharide and pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(6): 3015-3017.

[12] Yuan W, Hu Q, Cheng H, *et al.* Cell wall thickening is associated with adaptive resistance to amikacin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(5): 1089-1096.

[13] Parsek M R, Singh P K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 677-701.

[14] Harmsen M, Lappann M, Knochel S, *et al.* Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(7): 2271-2279.

[15] Kwon A S, Park G C, Ryu S Y, *et al.* Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 32(1): 68-72.

[16] Olson K M, Starks C M, Williams R B, *et al.* Novel pentadecenyl tetrazole enhances susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to gentamicin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(8): 3691-3695.

[17] Pettit R K, Weber C A, Lawrence S B, *et al.* *In vivo* activity of an-procide alone, and *in vitro* activity in combination with conventional antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 9): 1203-1206.

[18] McConeghy K W, LaPlante K L. *In vitro* activity of tigecycline in combination with gentamicin against biofilm-forming *Staphylococcus aureus*[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 68(1): 1-6.

[19] Parra-Ruiz J, Vidaillac C, Rose W E, *et al.* Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel *in vitro* model of *Staphylococcus aureus* biofilm[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(10): 4329-4334.

[20] Wu C M, Cao J L, Zheng M H, *et al.* Effect and mechanism of andrographolide on the recovery of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to several antibiotics[J]. *J Int Med Res*, 2008, 36(1): 178-186.

(收稿:2014-01-11;修回:2014-03-07)

(编辑 邓强庭)