

龙胆泻肝汤对阴道加德纳菌的体外抑制作用

吴 汉， 敖梅英， 陈雪丽， 陈 来， 左爱仁， 谢燕飞*， 邓可众
(江西中医药大学中医学院转化医学中心，江西 南昌 330004)

摘要：目的 研究龙胆泻肝汤对阴道加德纳菌（GV）的体外抑制作用。方法 利用稀释法检测龙胆泻肝汤对 GV 增殖的影响，并测定药物的最低抑菌浓度，通过革兰氏染色法观察龙胆泻肝汤对 GV 黏附人宫颈癌 HeLa 细胞的影响，MTT 法检测龙胆泻肝汤对 GV 细胞毒性的影响，96 孔微量板法检测龙胆泻肝汤对 GV 生物膜形成的影响，qRT-PCR 法检测龙胆泻肝汤对 GV *BAP*、*sialidase* mRNA 表达的影响。**结果** 龙胆泻肝汤水提物、70% 醇提物和 90% 醇提物对 GV 的最低抑菌浓度分别为（62.5±3.6）、（15.6±1.5）、（125.0±2.8）mg/mL。龙胆泻肝汤 70% 醇提物（1.56、15.6 mg/mL）能降低 GV 对 HeLa 细胞的黏附，抑制 GV 生物膜的形成（*P*<0.01），下调 *BAP*、*sialidase* mRNA 表达（*P*<0.05,*P*<0.01），龙胆泻肝汤 70% 醇提物（15.6 mg/mL）抑制 GV 对 HeLa 细胞的毒性作用（*P*<0.01）。**结论** 龙胆泻肝汤 70% 乙醇提物能显著抑制 GV 增殖，并能抑制 GV 细胞毒性、粘附能力和生物膜形成。

关键词：龙胆泻肝汤；阴道加德纳菌；细菌性阴道病；生物膜

中图分类号：R285.5 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2020)01-0075-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.016

Inhibitory effects of Longdan Xiegan Decoction on *Gardnerella vaginalis* in vitro

WU Han, AO Mei-ying, CHEN Xue-li, CHEN Lai, ZUO Ai-ren, XIE Yan-fei*, DENG Ke-zong

(Center Office of Traslational Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the inhibitory effects of Longdan Xiegan Decoction (LXD) on *Gardnerella vaginalis* (GV) in vitro. **METHODS** LXD was subjected to the following detections: its effect on GV proliferation by dilution method, and its minimum inhibitory concentration, its influence on GV adhesion to HeLa cells by Gram staining, its effect on GV cytotoxicity by MTT assay, its effect on the formation of GV biofilm by 96-well microplate method, its impact on the expressions of GV *BAP* and *sialidase* mRNA by qRT-PCR. **RESULTS** The minimum inhibitory concentrations of aqueous extract, 70% ethanol extract and 90% ethanol extract of LXD on GV were identified to be (62.5±3.6), (15.6±1.5) and (125.0±2.8) mg/mL, respectively. The 70% ethanol extract of LXD (1.56, 15.6 mg/mL) significantly reduced the adhesion of GV to HeLa cells, inhibited the formation of GV biofilm (*P*<0.01), down-regulated the expressions of *BAP* and *sialidase* (*P*<0.05, *P*<0.01), and the 70% ethanol extract LXD (15.6 mg/mL) inhibited the toxicity of GV on HeLa cells (*P*<0.01). **CONCLUSION** 70% ethanol extract of LXD can significantly inhibit proliferation of GV, reduce the adhesion and cytotoxicity of GV on HeLa cells, and restrain the GV biofilms formation.

KEY WORDS: Longdan Xiegan Decoction; *Gardnerella vaginalis*; bacterial vaginosis; biofilms

收稿日期：2019-03-17
基金项目：国家自然科学基金地区项目（81260242）；江西省自然科学基金青年项目（20142BAB214009）；江西省教育厅科技计划青年项目（GJJ12540）；江西省卫生厅中医药类项目（2013A083）；江西省卫生计生委科技计划项目（20185526）；江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目（JZYC19S34）
作者简介：吴 汉（1993—），男，硕士生，研究方向为中药复方与微生态调节。Tel: 13767031354, E-mail: 1165801162@qq.com
* 通信作者：谢燕飞，女，副教授，硕士生导师，从事病原菌与宿主相互作用机制研究。Tel: 18970970207, E-mail: 1047501830@qq.com

细菌性阴道病 (bacterial vaginosis, BV) 是阴道内正常菌群失调所致的一种混合感染, 具有发病率高^[1]、易复发^[2]、危害大^[3]等特点。阴道微生态正常情况下以各种乳酸杆菌为主, 它们可以大量产酸、产过氧化氢气体, 维持阴道酸性环境, 抑制有害细菌的生长。BV 患者体内以阴道加德纳菌 (*Gardnerella vaginalis*, GV) 为首的厌氧致病菌通过黏附阴道上皮细胞、产生致密生物膜, 分泌细胞毒素等作用使乳酸杆菌不能正常生长而大量死亡, 最终造成阴道微生态菌群环境紊乱^[4]。临床上常用药物为甲硝唑、替硝唑、克林霉素等, 虽然治愈率理想, 但复发率高, 易耐药^[5], 不适合孕妇等特殊人群^[6]。大量文献报道, 传统中药复方, 如龙胆泻肝汤^[7-12]、完带汤^[13-14]、治带方^[15]等在 BV 治疗及预防复发中具有确切疗效, 但相关作用机制并不明确。龙胆泻肝汤是中医治疗湿热带下的经典方, 上可泻肝胆之火, 下可清利湿热, 除口服外还可用药渣作用于局部, 以起到燥湿杀虫之功效。本实验旨在研究龙胆泻肝汤对 GV 的体外抑制作用, 为该方临床应用提供理论依据和指导。

1 材料

1.1 试剂与药物 按照《医方集解》原方比例从北京同仁堂药店购买龙胆泻肝汤方剂原料药; 哥伦比亚血琼脂平板 (北京陆桥技术股份有限公司, 批号 171108); BHI 肉汤培养基 (英国 Oxoid 公司, 批号 12276545); 革兰氏染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20150414); DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司, 批号 AC10206284); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 1743263); 胰蛋白酶 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20170315); MTT (上海铺镇生物有限公司, 批号 298-93-1); TRIzol (美国 Ambion 公司, 批号 3596026); qRT-PCR 反转录试剂盒 [宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 批号 AK4901]; SYBRII 荧光定量试剂 [宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 批号 AHX1020N]。

1.2 细菌与细胞 GV 为标准株 ATCC14018, 购于上海北诺生物有限公司。阴道卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*, LC) 由南昌大学魏华教授馈赠, 分离于健康女性阴道分泌物, 经 API 细菌学鉴定; Hela 细胞为本实验室保存。

1.3 仪器 MarkII 厌氧工作站 (荷兰 Mark 公司); DM2500 普通光学倒置显微镜 (德国徕卡公司); Thermo 3001 多功能全波长酶标仪 (美国

Thermo Scientific); Thermo 3110 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Scientific); Light Cycler96 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); RE601 旋转蒸发仪 (上海雅马拓科技贸易有限公司); SW-CJ-2D 超净工作台 (苏州净化设备有限公司)。

2 方法

2.1 龙胆泻肝汤各部位的制备 龙胆泻肝汤水提物: 按方称取组成药材, 6 倍量水浸泡 6 h, 大火煮沸 0.5 h 后小火煎 0.5 h, 滤过, 重复 2 次, 合并滤液, 离心后收集上清液, 减压干燥至恒重。龙胆泻肝汤 70% (95%) 醇提物: 按方称取组成药材, 6 倍量 70% (95%) 乙醇浸泡 6 h, 70% (95%) 乙醇回流提取 3 次, 滤过, 合并滤液, 离心后收集上清液, 减压干燥至恒重。

2.2 稀释法测定龙胆泻肝汤各部位对 GV 的最低抑菌浓度 按 2 倍稀释法, 用 BHI 培养基 (称取 BHI 固体培养基 3.7 g, 加入 100 mL 去离子水, 120 ℃ 高压灭菌, 临用前加入 10% 胎牛血清、1 mg/L 两性霉素 B) 配制龙胆泻肝汤各部位提取物, 初始浓度为 500 mg/mL (生药), 药物质量浓度从高到低 (500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.813、3.907、0 mg/mL) 设置。每管加入 BHI 培养基、GV/LC (接种量约为 1×10^4 CFU/mL) 和不同浓度药物。培养管在 37 ℃、5% CO₂ 下培养 48 h 后, 各取 200 μL 加入 96 孔酶标板中, 酶标仪测 OD₆₀₀, 每组样品均设置 2 个复管。为了去除培养基和药物颜色对菌体吸光值检测的干扰, 给药组数值均减去了培养基和各浓度下药物的吸光值 (药物浓度越高, 其自身吸光值也越高)。

2.3 革兰氏染色法观察药物对 GV 黏附入宫颈癌 Hela 细胞的影响 将灭菌的细胞爬片放置于细胞培养的 6 孔板中, 按每孔 8×10^5 个数量接种 Hela 细胞, 用 DMEM 完全培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养过夜。根据抑菌实验的结果, 选用的药物为龙胆泻肝汤 70% 乙醇提物。从冻存管中复苏 GV, 按 1% 的比例接种于 5 mL 培养管中, 设置 3 组, 分别为 BHI 组、BHI + 1.56 mg/mL 药物组、BHI + 15.6 mg/mL 药物组, 37 ℃、5% CO₂ 下培养 48 h, 8 000 r/min 离心 5 min, 用 DMEM 完全培养基稀释各组 GV, 以 MOI (菌/细胞) = 10 的比例加到细胞培养孔中, 37 ℃、5% CO₂ 下培养 4 h, PBS 洗涤 3 次, 将未黏附的菌体清洗干净, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 按照革兰氏染色试剂盒步骤进行染色, 光学显微镜油镜下观察。细胞黏附于细胞表面的黏

附率评分：未黏附，-；黏附 1%~25%，+；黏附 25%~50%，++；黏附>50%，+++。

2.4 MTT 法检测药物对 GV 细胞毒性的影响 取 GV 冻存管，以 1% 接种量转接至 2 只 5 mL 培养管，37℃、5% CO₂ 下分别用 BHI_s 培养基和含药（15.6 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提物）BHI_s 培养基培养 48 h 后，8 000 r/min 离心 5 min，用 DMEM 完全培养基将菌体混悬至相同浓度（1×10⁶ CFU/mL）备用。取细胞培养用 96 孔板，按每孔 1×10⁴ 个数量接种 HeLa 细胞，培养过夜。将上述 BHI_s 培养基和含药 BHI_s 培养基培养的 GV 分别按照 MOI=1 和 MOI=10 的比例加到 HeLa 细胞中，分别培养 1、2、3、4 h 后 PBS 洗涤 2 次，吸去上清，每孔加入 100 μL 1% MTT，37℃、5% CO₂ 下放置 4 h 后，每孔加入分析纯 DMSO 100 μL，酶标仪测 OD₄₉₀，每个样品设置有 5 个复孔。

2.5 96 孔微量板法检测药物对 GV 生物膜形成能力的影响 96 孔微量板法检测细菌的生物膜形成能力是被广泛应用的一种方法^[16-17]，细菌形成生物膜以后，与含有明胶的培养板结合紧密，不易被冲洗掉，结晶紫染色后可呈现更深的着色。取细胞培养用 96 孔板，每孔加入 100 μL 0.1% 明胶，37℃放置 4 h，小心吸去上清，备用。分别用 BHI_s 培养基、含药（1.56、15.6 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提物）BHI_s 培养基配制 GV 悬液，终浓度为 1×10⁷ CFU/mL。将上述 GV 按 0.2 mL/孔接入明胶包被的 96 孔板中，每个样品设置 4 个复孔，37℃、5% CO₂ 下培养 60 h 后 PBS 洗涤 3 次，置于无菌超净台中吹干，每孔加入 100 μL 甲醇固定 30 min，弃去甲醇后每孔加入 1% 结晶紫，染色生物膜 5 min，将 96 孔板置于水龙头下均匀冲洗，晾干后每孔加入 200 μL 33% 冰醋酸，全波长酶标仪测定 OD₅₉₀。

2.6 荧光定量 PCR 检测药物对 GV 中生物膜相关蛋白（biofilm associated protein，BAP）和唾液酸酶（sialidase）基因表达的影响 BAP 是一种巨大的细胞壁锚定黏附素，可同时介导与宿主细胞的黏附及细胞间黏附，对生物膜的形成起着重要作用^[18]。sialidase 是 GV 分泌的细胞毒性物质之一，能降解阴道粘液，直接损伤阴道上皮细胞。

设置对照组（GV + BHI_s 培养基）、BHI_s + 1.56 mg/mL 药物组（GV+BHI_s 培养基+

1.56 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提物）、BHI_s + 1.56 mg/mL 药物组（GV + BHI_s 培养基+ 15.6 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提物）。将过夜生长的 GV 按 1：20 比例接种于 5 mL 上述培养液中，厌氧环境下 37℃ 静置培养 24 h 后，用 PBS 洗涤 2 次，转移到 500 μL TRIzol 裂解液中。按照 TRIzol 裂解液说明书提取纯化各组菌体总 RNA，并溶于含 30 μL RNase-free 的水中，用 Nanodrop one 对 RNA 溶液进行定量分析。吸取 1 μg RNA，逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA，按 1：100 比例稀释后取 2 μL cDNA 溶液作为模板，利用试剂盒（SYBR® Premix Ex Taq™）进行荧光定量 PCR。内参为菌体 16sDNA 片段，对应的上下游引物分别为 *Gv16sc* 正向 5'-AGGTACACTCACCCGAAAGC-3'，反向 5'-CA-CATTGGGACTGAGATACGG-3'；*BAP* 正向 5'-GT-GTCATTGAGCACACTTGC-3'，反向 5'-GTTGTTA-AAGAACACATCGAAG-3'；*sialidase* 正向 5'-AGTCGCACTCCGCGCAAGTC-3'，反向 5'-GACGACGGCGAATGGCACGA-3'，反应在 Lightcycler96 仪上进行。采用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据处理。

3 结果

3.1 龙胆泻肝汤各部位对 GV 的抑制作用 龙胆泻肝汤水提物、70% 醇提物、95% 醇提物对 GV 的最低抑菌质量浓度分别为（62.5±3.6）、（15.6±1.5）、（125.0±2.8）mg/mL，而龙胆泻肝汤 70% 醇提物对阴道内 LC 最低抑菌质量浓度为（62.5±1.6）mg/mL，远高于 GV，见图 1，说明它对 GV 的抑菌作用具有选择性。因此，后续实验选择龙胆泻肝汤 70% 醇提物、GV 进行实验。

3.2 龙胆泻肝汤 70% 醇提物对 GV 黏附入宫颈癌 HeLa 细胞的影响 经龙胆泻肝汤 70% 醇提物（1.56、15.6 mg/mL）共培养的 GV 对 HeLa 细胞的黏附减少，见图 2、表 1，说明它能抑制 GV 的细胞黏附能力，从而对细菌性阴道病起到积极的治疗作用。

3.3 龙胆泻肝汤 70% 醇提物对 GV 细胞毒性的影响 GV 对 HeLa 细胞有较强的细胞毒性，与作用时间和 MOI 值相关。随着 GV 浓度增加，作用于 HeLa 细胞的时间延长，细胞毒性也增强。15.6 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提物共培养 GV 后，HeLa 细胞毒性减弱；MOI=10 时与 BHI_s 组比较，15.6 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提物作用 4 h 后细胞存活率增加（P<0.05）。见图 3。

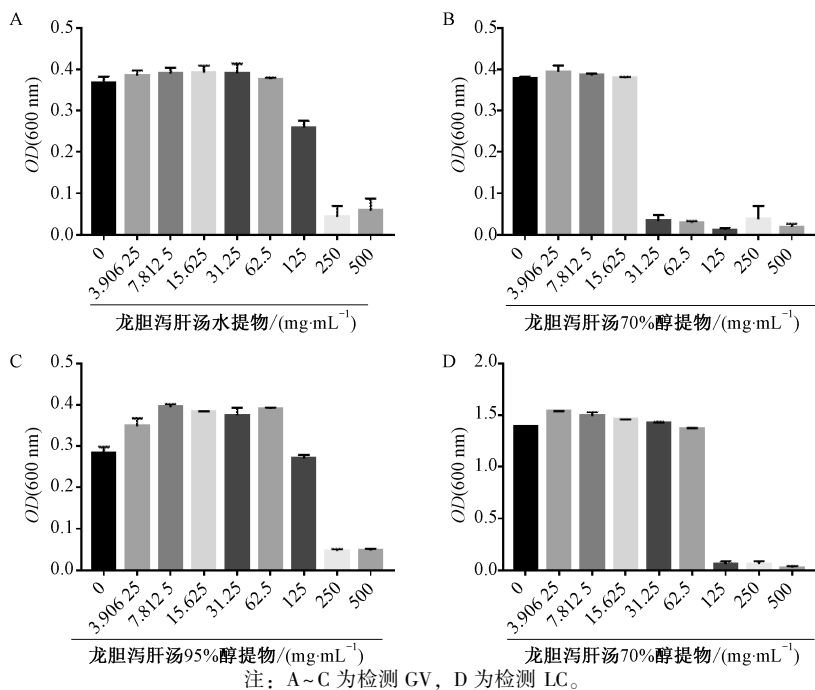


图 1 龙胆泻肝汤不同提取部位对 GV 和 LC 的抑菌作用

Fig. 1 Bacteriostatic effects of different extractions of LXD on GV and LC

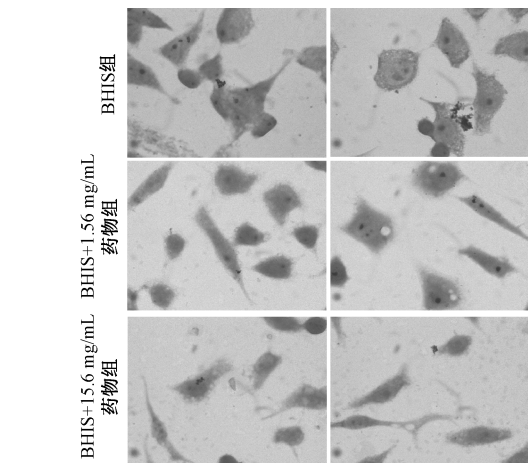


图 2 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV 黏附 Hela 细胞的影响 (×100)

Fig. 2 Effects of 70% ethanol extract of LXD on adhesion of GV bacteria on Hela cells (×100)

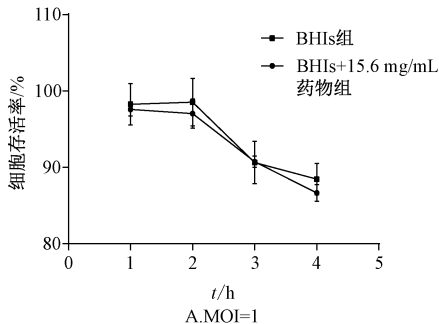
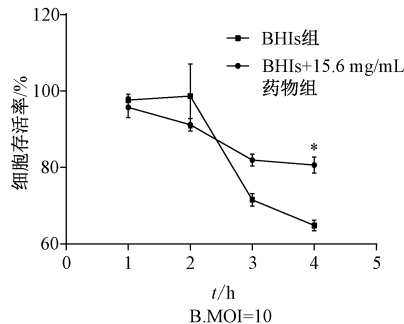


表 1 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物处理后 GV 对 Hela 细胞黏附的评分

组别	评分
BHIs 组	+++
BHIs+1. 56 mg/mL 药物组	++
BHIs+15. 6 mg/mL 药物组	+

3.4 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV 生物膜形成的影响 与 BHI 组比较, 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物 (1.56、15.6 mg/mL) 能抑制 GV 生物膜形成 ($P<0.01$)。见图 4。

3.5 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV BAP、sialidase mRNA 的影响 与 BHI 组比较, 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物 (1.56、15.6 mg/mL) 能降低 GV BAP、

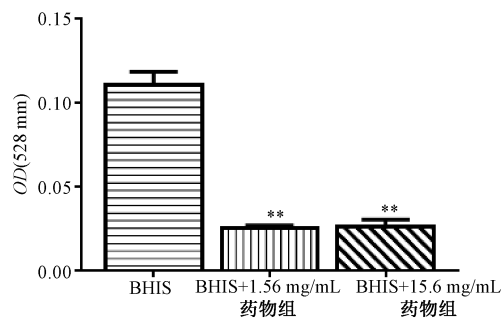


注：与 BHI 组比较, * $P<0.05$ 。

图 3 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV 细胞毒性的影响

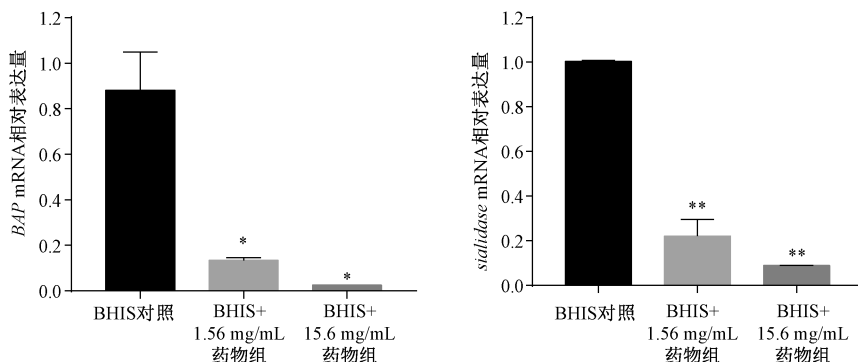
Fig. 3 Effects of 70% ethanol extract of LXD on cytotoxicity of GV

sialidase mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 5。



注：与 BHIs 组比较，** $P<0.01$ 。

图 4 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV 生物膜形成的影响
Fig. 4 Effects of 70% alcohol extract of LXD on biofilm formation of GV bacteria



注：与 BHIs 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 5 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV BAP、sialidase mRNA 表达的影响
Fig. 5 Effects of 70% ethanol extract of LXD on the expression of BAP and sialidase mRNA in GV

GV 是兼性厌氧、革兰氏染色阴性、非运动、不定形态的小棒状菌，虽然在阴道 pH 4~5 之间不生长，但它可以在此环境下黏附在阴道上皮细胞表面，形成致密的生物膜。生物膜在细菌性阴道病的发病过程中起着重要的作用，它既能够保护致病菌在不利环境下存活^[19]，也能够抑制药物的渗入，使致病菌逃脱宿主的免疫攻击^[20]，抗生素和宿主免疫都不能完全消除生物膜，这也是导致细菌性阴道病复发的主要因素^[21]。此外，GV 还能释放一些细胞毒性物质，如细菌素、vaginolysins、唾液酸酶、蛋白酶等^[22]，直接损伤阴道上皮细胞，并引起相关的病理反应。

鉴于临床上龙胆泻肝汤局部熏洗对细菌性阴道病有确切疗效，本研究考察了龙胆泻肝汤在体外如何影响 GV 的增殖、黏附、生物膜形成、细胞毒性，这也是构成其致病性的主要四大因素。

结果表明，龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV 具有较好的体外抑菌作用，最低抑菌质量浓度为

4 讨论

龙胆泻肝汤是中医治疗湿热带下的经典方，本方以清上逆之实火、除下注之湿热的龙胆草为主，横冲直撞，荡邪外出；以清泄并举的黄芩、栀子为辅，清热以解百毒，泄火而利三焦；佐以泽泻、木通、午前子三味引火从小便而出，乃宗《内经》“在下者引而竭之”之意；当归、地黄养血柔肝，以防苦寒伤肝；柴胡为肝胆疏利之要药，甘草调和诸药。全方配伍臻妙，虽苦寒而不伤胃，祛邪兼收扶正固本，诸药合用，共奏清热利湿、扶正祛邪之功效。此方为临床治疗 BV 的经典有效方剂，得到广泛应用^[7-12]，兼有口服和局部熏洗，均有确切的疗效，但其有效部位和作用机制尚不清楚。

(15.6 ± 1.5) mg/mL，而对阴道卷曲乳杆菌的为 (62.5 ± 1.6) mg/mL，说明龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV 具有选择性抑制作用，阐释了中药复方在治疗细菌性阴道病中“扶正祛邪”的作用机制。此外，龙胆泻肝汤 70% 醇提取物能抑制 GV 黏附 Hela 细胞，从而减少它对阴道上皮细胞的“占位”，有利于阴道微环境中乳酸杆菌的定位与繁殖。细胞毒性实验表明，当 MOI = 10 时，GV 能在 4 h 内使 Hela 细胞死亡率达到 35.2%，而用 15.6 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物共培养后的 GV 在同等条件下，Hela 细胞死亡率降低到 19.4%，说明龙胆泻肝汤 70% 醇提取物能够有效抑制 GV 的细胞毒性。此外，1.56 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提取物能抑制 GV 生物膜的形成，可能是其治疗细菌性阴道病的主要机制之一。

然后，通过 qRT-PCR 法测定了龙胆泻肝汤 70% 醇提取物对 GV 中 BAP、sialidase mRNA 表达的影响，其中前者能促进 GV 生物膜形成，后者可增强

GV 细胞毒性; 1.56 mg/mL 龙胆泻肝汤 70% 醇提物能显著抑制这 2 个蛋白的转录, 提示两者可能是药物作用的重要靶点。

本研究通过一系列体外实验阐述了龙胆泻肝汤 70% 醇提物抑制 GV 的作用效果, 为该方治疗细菌性阴道病提供了理论依据, 并寻得了更有效的部位, 同时对其作用机制进行了初步探讨。今后, 将建立适当的动物模型, 在体内进一步探讨龙胆泻肝汤作用机制及其对机体免疫系统的影响, 并与体外实验相互佐证。

参考文献:

[1] Anderson M R, Klink K, Cohn A. Evaluation of vaginal complaints[J]. *JAMA*, 2004, 291(11): 1368-1379.

[2] Bradshaw C S, Morton A N, Hocking J, et al. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence[J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(11): 1478-1489.

[3] Brette F, Rozenberg P, Pascal A, et al. High *atopobium vaginalis* and *gardnerella vaginalis* vaginal loads are associated with preterm birth [J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 60 (6): 860-867.

[4] Ling Z, Kong J, Liu F, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis [J]. *BMC Genomics*, 2010, 9(11): 488.

[5] 谢明水, 刘 杨, 李 玲. 随州地区阴道加德纳菌生物型分布及药敏结果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21 (1): 186-187.

[6] Klebanoff M A, Hillier S L, Nugent R P, et al. Is bacterial vaginosis a stronger risk factor for preterm birth when it is diagnosed earlier in gestation? [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(2): 470-477.

[7] 郑静飞. 龙胆泻肝汤治疗湿热下注型细菌性阴道病临床疗效及对阴道内环境改变的影响[J]. 新中医, 2015, 47(6): 178-180.

[8] 农文芳. 加减龙胆泻肝汤治疗带下病湿热下注的临床研究[J]. 中医临床研究, 2014, 6(4): 35-36.

[9] 吴飞华. 龙胆泻肝汤改善湿热下注型细菌性阴道病相关参数临床研究[J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24(16): 3636-3637.

[10] 杨 彦, 许晓芬. 龙胆泻肝丸治疗细菌性阴道病的临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(12): 35.

[11] 杨 彦, 范红霞. 龙胆泻肝丸 (汤) 治疗细菌性阴道病的临床与实验研究 [J]. 医学理论与实践, 2005, 18 (11): 30-32.

[12] 张小玲, 徐 谦, 姜惠中. 龙胆泻肝汤治疗细菌性阴道病的临床观察[J]. 中国医药学报, 1999, 14 (2): 47-49.

[13] 王秋梅. 加味完带汤治疗脾虚湿盛型细菌性阴道病的临床观察[J]. 北京中医药, 2011, 30(5): 384-385; 393.

[14] 谭秀芬, 赵秋生. 完带汤加减预防细菌性阴道病复发的疗效观察[J]. 新中医, 2011, 43(5): 87-88.

[15] 杜永红, 夏 阳. 治带方治疗细菌性阴道病的临床观察 [J]. 天津中医药, 2004, 21(2): 98-101.

[16] Verstraeten H, Swidsinski A. The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2013, 26(1): 86-89.

[17] Jennifer P, Annica S, Philippe H, et al. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes [J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt2), 392-399.

[18] Latasa C, Solano C, Penadés J R, et al. Biofilm-associated proteins[J]. *C R Biol*, 2006, 329(11): 849-857.

[19] Sapi E, Bastian S L, Mpoy C M, et al. Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* in vitro[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48277.

[20] Singh R, Ray P, Das A, et al. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65 (9): 1955-1958.

[21] Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, et al. Response of *Gardnerella vaginalis* biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2011, 61(1): 41-46.

[22] Udayalaxmi J, Bhat G K, Kotigadde S. Biotypes and virulence factors of *Gardnerella vaginalis* isolated from cases of bacterial vaginosis [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2011, 29 (2): 165-168.