

· 论 著 ·

诃子鞣质对白色念珠菌及其生物被膜的影响

向 丽¹, 周铁军², 叶迎春¹, 王光西¹

(泸州医学院: 1. 病原生物学教研室; 2. 病理学教研室, 四川泸州 646000)

摘要:目的 研究诃子鞣质对生物被膜型白色念珠菌的抑制作用。方法 采用 MTT 法检测诃子鞣质对生物被膜形成的影响; 光镜下观察生物被膜内白色念珠菌的形态学变化; 采用荧光显微镜观察吖啶橙/溴化乙锭染色的生物被膜内白色念珠菌的死亡方式。结果 诃子鞣质对生物被膜的形成及成熟期生物被膜中的白色念珠菌有抑制作用, 并存在时间和剂量依赖性; 鞣质导致被膜内白色念珠菌细胞变形, 形态结构改变, 芽管和假菌丝形成抑制, 但未见确切细胞凋亡。结论 诃子鞣质对白色念珠菌生物被膜的形成有抑制作用, 它可能通过非凋亡途径导致生物被膜内白色念珠菌的死亡。

关键词:鞣质; 念珠菌, 白色; 生物膜; 诃子

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)02-0133-04

Effects of tannins extracted from Terminalia chebula Retz on Candida albicans and its biofilm

Xiang Li¹, Zhou Tiejun², Ye Yingchun¹, Wang Guangxi¹

(1. Department of Pathogenic Biology; 2. Department of Pathology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effects of tannins extracted from Terminalia chebula Retz on Candida albicans in biofilm. Methods MTT assay was used to detect the effects of tannins extracted from Terminalia chebula Retz on biofilm formation. Light microscope was employed to observe the morphological changes of Candida albicans in biofilm, and fluorescence microscope was adopted to survey the death mode of Candida albicans in biofilm by acridine orange/ethidium bromide staining. Results Tannins extracted from Terminalia chebula Retz showed inhibitory effects on biofilm formation and Candida albicans in mature biofilm in a time- and dose-dependent manner. Tannins led to cellular deformation, morphological changes of Candida albicans in biofilm, and inhibited germ tubes and pseudohyphae formation, while there was no exact apoptosis was observed. Conclusion Tannins extracted from Terminalia chebula Retz possess inhibitory effect on biofilm formation of Candida albicans, and lead to Candida albicans in biofilm death probably via non-apoptosis pathway.

Key words: tannins; Candida albicans; biofilm; Terminalia chebula Retz

近年,越来越多的生物材料应用于人体,使人群中真菌感染率不断增加,尤其以白色念珠菌的感染最为普遍。生物材料表面可见白色念珠菌(又称白假丝酵母)以生物被膜的形式黏附生长,对常用抗菌药物表现为高度的耐药性。唑类抗真菌药是治疗白色念珠菌感染的主要药物,但因其为白色念珠菌的抑菌剂,不能完全根治感染,容易复发,而重复用药又会导致白色念珠菌发生耐药性变异,给临床抗感染治疗带来更大的困难。研究表明中药可通过抑制细菌生物被膜形成等多种机制逆转细菌耐药性^[1]。诃子为使君子科植物诃子的干燥成熟果实^[2],研究发现诃子具有良好的抗菌活性^[3-4]。本试验拟通过体外药物敏感试验并结合形态学观察,研究诃子鞣质对生物被膜型白色念珠菌的抑制作用,为诃子抗菌机制的研究奠定理论基础。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂与仪器 主要试剂:乙醇、碳酸钠为成都金山化学试剂有限公司产品,没食子酸标准品(批号: MUST-10080401,纯度: ≥98%)购自中国食品药品检定所,酚试剂购自上海源聚生物科技有限公司,沙氏培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司, RPMI 1640 购自美国 ThermoFisher 公司, 3-(N-吗啡啉)丙磺酸[3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid, MOPS]购自上海生工生物股份有限公司,吖啶橙(acridine or-

ange, AO)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)为加拿大 BBI 公司产品, MTT 购自美国 Sigma 公司。主要仪器包括: JY96-II 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)、SP-752 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、GHP-9080 隔水式恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司)、光学显微镜(日本 Olympus 公司)、荧光显微镜(日本 Nikon 公司)及 ELx800 酶标仪(美国 BioTek 公司)等。

1.2 研究对象 诃子购自泸州宝光医药有限公司,白色念珠菌标准株 ATCC10231 为泸州医学院病原生物学与免疫学实验中心惠赠。

1.3 标准曲线回归方程的建立 取 6 只 10 mL 具塞试管,分别加入 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 浓度为 10 μg/mL 的没食子酸标准溶液,向每只试管加入 1.5 mL 酚试剂,摇匀,再加入 6 mL 10% 碳酸钠溶液,摇匀,蒸馏水定容至 10 mL, 30 °C 水浴反应 1 h。紫外分光光度计在 765 nm 波长处测定标准溶液的吸光度。

1.4 诃子鞣质提取物的制备和检测^[5] 称取诃子果实粉 10 g,溶于 100 mL 60% 乙醇中, 40 W 超声波提取 25 min,提取液抽滤,旋转蒸发获浓缩液,浓缩液经 125 °C 灭菌 20 min 后备用。采用福林-酚比色法进行检测,根据回归方程计算诃子提

取物中鞣质的含量,浓缩液-80℃保存。使用前用 RPMI 1640-MOPS 倍比稀释。

1.5 白色念珠菌悬液的制备 将白色念珠菌接种于沙氏固体培养基,37℃培养 2~3 d,传代 2 次,用 0.85% 的盐水洗脱制成白色念珠菌悬液,血球计数板计数,RPMI 1640-MOPS 调整浊度为 $(1.0\sim 5.0)\times 10^6$ CFU/mL。

1.6 诃子鞣质对生物被膜形成的抑制 将白色念珠菌悬液加入 96 孔板(100 μL/孔),将其分为鞣质组、不加诃子鞣质的真菌对照组和不加真菌的鞣质对照组,每组设 5 个复孔。37℃培养 2 h,PBS 清洗 3 次,彻底清除没有黏附的浮游菌株,每 24 小时更换培养基。在培养的第 5、30、48 h,鞣质组加入倍比稀释的鞣质提取液,100 μL/孔,鞣质提取液最终稀释度为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64,将 3 组悬液置于 37℃继续孵育 48 h,每孔加入 20 μL MTT,37℃孵育 4 h 后,小心弃去孔内液体,加入二甲基亚砜 150 μL,震荡 10 min,酶标仪 490 nm 处检测吸光度(absorbance,A)值。抑制率公式如下:抑制率(%)=(1-鞣质组 A 值/真菌对照组 A 值)×100%。

1.7 成熟生物被膜的构建及诃子鞣质对成熟生物被膜的影响 将白色念珠菌悬液加入 96 孔板(100 μL/孔),分组同 1.6 部分。37℃培养 2 h,PBS 清洗 3 次,彻底清除没有黏附的浮游菌株,每 24 h 更换培养基,连续培养 72 h 后,PBS 清洗 3 次,加入 RPMI 1640-MOPS 培养基(100 μL/孔),鞣质组加入鞣质提取液(100 μL/孔),鞣质提取液最终稀释度为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64。37℃分别孵育 24、48、72 h,每孔加入 20 μL MTT,37℃孵育 4 h 后,小心弃去孔内液体,加入二甲基亚砜 150 μL,震荡 10 min,酶标仪 490 nm 处检测 A 值。抑制率公式同 1.6 部分。

1.8 诃子鞣质对生物被膜型白色念珠菌形态结构的影响 将白色念珠菌悬液加入置于 24 孔板内的盖玻片上,构建成熟的

白色念珠菌生物被膜,72 h 后,PBS 清洗 3 次,加入 RPMI 1640-MOPS 培养基(1 mL/孔),再加入终浓度为 53.08 mg/mL 的鞣质提取液(1 mL/孔),真菌对照组加入 RPMI 1640-MOPS 培养基(2 mL/孔),37℃孵育 48 h 后,PBS 清洗盖玻片 3 次,采用光学显微镜直接观察生物被膜型白色念珠菌形态结构的变化。另将 AO(100 mg/L)和 EB(100 mg/L)各 5 μL 混匀后加入样品区,染色 30 s,荧光显微镜观察。AO 用 450~490 nm 蓝光激发,显示绿色,为活细胞;EB 用 510~570 nm 绿光激发,显示红色,为死细胞。

1.9 统计学处理 应用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 诃子提取物中鞣质含量的测定 以标准溶液的浓度为横坐标,以 A 值为纵坐标,绘制标准曲线,线性回归方程为: $Y=0.121X+0.004,r^2=0.999$,表明没食子酸在 0.5~2.5 μg/mL 范围内与其 A 值呈良好的线性关系。根据回归方程,诃子提取物中鞣质含量为 106.16 mg/mL。

2.2 诃子鞣质对生物被膜形成的影响 在生物被膜形成的 3 个阶段(早期、中期及成熟期),诃子鞣质对白色念珠菌的抑制率随鞣质浓度的升高而增加,呈剂量依赖性,各浓度组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$);同一浓度不同时期比较,差异也有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.3 诃子鞣质对成熟生物被膜的影响 在作用时间相同的条件下,诃子鞣质对白色念珠菌的抑制率随鞣质浓度升高而增加,呈剂量依赖性,各浓度组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$);在相同鞣质浓度条件下,抑制率随鞣质作用时间延长而升高,呈时间依赖性,差异也有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 诃子鞣质对生物被膜形成期白色念珠菌的抑制情况

组别	早期		中期		成熟期	
	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
真菌对照组	0.173±0.009	—	0.316±0.045	—	0.562±0.036	—
鞣质组(mg/mL)						
1.66	0.161±0.002	6.936	0.303±0.011	4.114	0.541±0.005	3.737
3.12	0.146±0.006	15.607	0.281±0.004	11.076	0.515±0.023	8.363
6.64	0.103±0.010	40.462	0.215±0.005	31.962	0.446±0.013	20.641
13.27	0.055±0.004	68.208	0.142±0.006	55.063	0.369±0.009	34.342
26.54	0.033±0.005	80.925	0.113±0.008	64.241	0.309±0.010	45.018
53.08	0.019±0.003	89.017	0.086±0.002	72.785	0.214±0.007	61.922

—:表示此项无数据。

表 2 诃子鞣质对成熟生物被膜白色念珠菌的抑制情况

组别	24 h		48 h		72 h	
	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
真菌对照组	0.624±0.042	—	0.753±0.046	—	0.877±0.046	—

续表 2 诃子鞣质对成熟生物被膜白色念珠菌的抑制情况

组别	24 h		48 h		72 h	
	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
鞣质组(mg/mL)						
1.66	0.607±0.004	2.724	0.725±0.012	3.718	0.829±0.021	5.473
3.12	0.583±0.014	6.571	0.673±0.025	10.624	0.754±0.024	14.025
6.64	0.553±0.009	11.378	0.609±0.013	19.124	0.603±0.027	31.243
13.27	0.467±0.013	25.160	0.523±0.011	30.544	0.485±0.011	44.698
26.54	0.406±0.015	34.936	0.419±0.015	44.356	0.337±0.018	61.574
53.08	0.335±0.010	46.314	0.261±0.010	65.339	0.220±0.022	74.914

—:表示此项无数据。

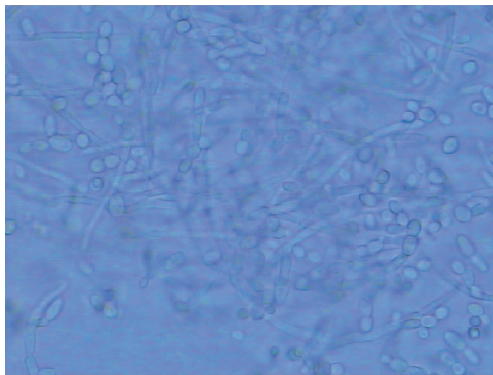


图 1 真菌对照组(光镜 ×400)

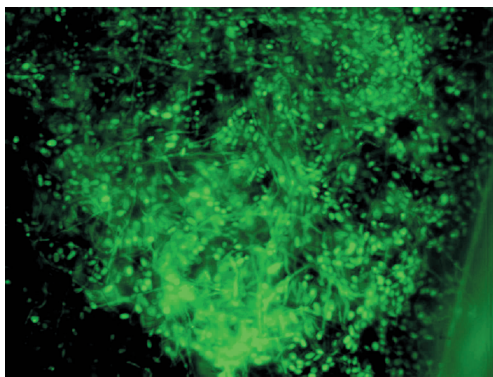


图 2 真菌对照组(AO/EB 染色 ×400)



图 3 诃子鞣质组(光镜 ×400)

形态规则,真菌主要表现为菌丝相,大量菌丝交织呈网状(图 1);荧光显微镜下,真菌对照组被膜内主要为呈绿色信号的白色念珠菌,核染色质着色均匀,荧光较强,细胞核轮廓清楚,核膜光滑,未见皱缩及发泡现象,有大量交织成网状的假菌丝(图 2)。光镜下,鞣质组生物被膜结构受到破坏,部分白色念珠菌从膜上脱落,膜内白色念珠菌数量比真菌对照组少,细胞形态不规则,大小不等,细胞质不均一,有较少芽管形成,芽管形态不规则,菌丝相细胞比真菌对照组明显减少(图 3);荧光显微镜下,鞣质组被膜内呈绿色信号的白色念珠菌明显比真菌对照组少,呈红色信号的白色念珠菌明显增多,但细胞总数量减少,大部分细胞核染色质着色均匀,荧光较强,细胞核轮廓清楚,核膜光滑,部分细胞核体积增大,核染色质着色不均且荧光较弱,芽管和假菌丝形成较少(图 4)。

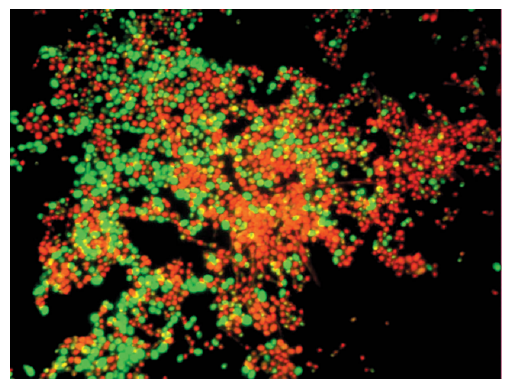


图 4 诃子鞣质组(AO/EB 染色 ×400)

3 讨论

生物被膜是细菌、真菌等微生物与胞外多糖基质等成分共同形成的一个具有三维空间结构的表面生长结构,常黏附于有生命或无生命的物体表面。近年,由于免疫抑制剂、广谱抗菌药物,各种侵袭性治疗手段的应用,医院内以白色念珠菌为主的深部真菌感染率逐年上升^[6]。而白色念珠菌在临床使用的人工瓣膜、人工关节、导管插管等生物材料表面常以生物被膜的形式生长,带有白色念珠菌生物被膜的植入性医疗器械可将此种病原迁移性地种植于深在组织和心血管系统中,成为医院内感染的主要病原体^[7]。以生物被膜形式生长的真菌可通过其屏障作用、生物被膜中细胞缓慢的生长特性以及生物被膜耐药相关基因的表达等多种机制而产生高度的耐药性^[8-10]。

目前临床常用的抗真菌药物不良反应大,真菌耐药现象普

遍。因此,借助真菌体外药物敏感性研究,从天然植物中筛选高效低毒的抗真菌药越来越受到国内、外学者的广泛重视。研究显示,诃子及诃子的复方制剂对变异链球菌、黏性放线菌、嗜酸乳杆菌、一些耐药菌株及白色念珠菌等有较好的抑制作用,尤其对白色念珠菌的抑制效果最好^[3-4]。鞣质,又称单宁、鞣酸,是诃子药理作用的主要活性物质,研究表明鞣质具有良好的抗菌效应^[11-12],其机制主要是:鞣质的收敛性可导致其与细菌酶类或酶底物发生络合作用;鞣质对微生物膜具有破坏性;鞣质与金属离子具有很强的结合能力^[13]。Chusri 等^[14]的研究就发现,鞣酸可通过破坏 G-菌外膜的稳定性以及抑制药物外排泵的作用增强多重耐药菌株鲍氏不动杆菌对新生霉素、利福平等抗菌药物的敏感性。

本实验结果显示,在被膜形成的各个时期以及生物被膜成熟后,诃子鞣质都显示了较好的抗菌效应,但被膜形成早期的抑制率明显高于成熟期,说明真菌对鞣质的耐受性越来越高,其可能原因:(1)随着被膜的成熟,白色念珠菌的数量增加,胞外多聚物也相应增多;(2)耐药基因表达上调等。对成熟的白色念珠菌生物被膜,实验结果显示其抑制率呈时间和剂量依赖性,并通过显微镜观察到白色念珠菌细胞变形、死亡,细胞质不均一,芽管、假菌丝明显减少等现象,提示白色念珠菌的细胞壁、细胞膜结构完整性受到破坏,芽管、假菌丝形成受到抑制。在荧光染色中并未发现明显的细胞凋亡现象,仅发现有少数细胞的细胞核肿胀增大,染色变淡,提示诃子鞣质可能不是通过诱导细胞凋亡而是通过肿胀坏死或其他途径导致了真菌死亡。

白色念珠菌生物被膜的形成经历了黏附、聚集、信号转导、细胞内基因的选择性表达等一系列过程。白色念珠菌通过细胞壁上的蛋白质与材料表面结合,缺乏黏附分子的白色念珠菌在体内、外均不能形成成熟的生物被膜^[15]。Lin 等^[16]研究发现从诃子中提取的诃子鞣酸可通过阻止 1 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus-1, HSV-1)膜上糖蛋白与细胞表面的氨基葡聚糖的相互作用,抑制 HSV-1 对细胞的黏附、侵入、在细胞间的扩散和二次感染,在使用核苷类药物时可降低病毒耐药性的发生。本研究在观察诃子鞣质组生物被膜时发现,部分白色念珠菌从膜上脱落,呈浮游状态,因此,诃子鞣质也可能通过阻止白色念珠菌对盖玻片的黏附,使浮游型真菌不能及时发展成被膜型真菌,从而增加了白色念珠菌对鞣质的敏感性,但也可能是因为白色念珠菌死亡后从膜上脱落。如果将诃子鞣质与唑类抗真菌药物联合使用,能否增强生物被膜型白色念珠菌对唑类药物的敏感性而减少耐药性的发生,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 蔡燕,邢艳,谢文光. 中药抗菌作用研究进展[J]. 中国医药导报,2011,8(6):9-10.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出

版社,2001.

- [3] 李艳红,刘娟,杨丽川,等. 6 种云南天然药物对口腔优势菌的抗菌活性测定[J]. 华西口腔医学杂志,2010,28(2):199-202.
[4] 傅永红,李红英,张春江,等. 藏药十八味诃子利尿丸抗菌性研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):406-408.
[5] 王自军,杨红兵,齐誉,等. 正交设计研究石韦总黄酮和鞣质提取工艺[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):463-464.
[6] 赵娜,陈虹,陶娟. 侵袭性肺部真菌感染的耐药性分析及临床疗效评估[J]. 重庆医学,2011,40(6):576-578.
[7] 侯幼红. 白念珠菌生物膜与侵袭及耐药[J]. 中国真菌学杂志,2007,2(3):175-178.
[8] Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 8):999-1008.
[9] Watamoto T, Samaranayake LP, Egusa H, et al. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 9):1241-1247.
[10] 亓庆国, Lafleur MD. 药物流出泵基因在白假丝酵母菌生物膜耐药性产生机制中的作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(2):191-194.
[11] 赵今,哈木拉提·吾甫尔,林静,等. 没食子鞣质及其有效提取物对牙菌斑生物膜形态结构和活性的作用[J]. 科技导报, 2009, 27(7):24-28.
[12] 许颖,李福明. 中药五倍子对白色念珠菌生物膜影响的体外研究[J]. 黑龙江医药科学, 2008, 31(4):1-2.
[13] Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, et al. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 48(4):487-491.
[14] Chusri S, Villanueva I, Voravuthikunchai SP, et al. Enhancing antibiotic activity: a strategy to control *Acinetobacter* infections[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(6):1203-1211.
[15] Li F, Svarovsky MJ, Karlsson AJ, et al. Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo[J]. Eukaryot Cell, 2007, 6(6):931-939.
[16] Lin LT, Chen TY, Chung CY, et al. Hydrolyzable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein-glycosaminoglycan interactions to inhibit herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread[J]. J Virol, 2011, 85(9):4386-4398.

(收稿日期:2012-02-20 修回日期:2012-08-16)