

• 论 著 •

山苍子精油对白色念珠菌生物被膜芽管形成的抑制作用研究

刘林波¹, 刘琦¹, 刘晓莺², 谢中斌¹, 武翠娥¹, 郭瑞林^{3△}

(1. 榆林市第二医院检验科, 陕西榆林 719000; 2. 榆林市第一医院检验科, 陕西榆林 719000; 3. 陕西中医学院第二附属医院检验科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 研究山苍子精油在体外对白色念珠菌生物被膜芽管形成初始阶段的抑制作用, 为预防由白色念珠菌生物被膜引起的难治性感染提供新思路。方法 通过血清芽管实验, 观察不同浓度山苍子精油对白色念珠菌出芽生长现象的抑制作用。结果 2~5 μL/mL 的山苍子精油对白色念珠菌出芽生长的抑制率为 100.0%, 但不具有杀菌作用, 0.25 μL/mL 的山苍子精油对白色念珠菌芽管生长的抑制率为 85.0%。结论 2~5 μL/mL 的山苍子精油可完全抑制白色念珠菌初始阶段生物被膜的形成, 但不能杀灭酵母细胞。0.25 μL/mL 几乎不能抑制芽管生长。

关键词:山苍子精油; 白色念珠菌; 生物被膜; 血清芽管实验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.019 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)20-2850-02

Inhibition of litsea cubeba oil on biofilm initial formation stage of *Candida albicans*

LIU Linbo¹, LIU Qi¹, LIU Xiaoying², XIE Zhongbin¹, WU Cui'e¹, GUO Ruilin^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Yulin, Yulin, Shaanxi 719000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Yulin, Yulin, Shaanxi 719000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Shaanxi Traditional Chinese Medicare University, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: **Objective** To study inhibition of litsea cubeba oil on biofilm initial formation stage of *Candida albicans*, in order to provide new sight for prevention and treatment of refractory infections arising from *Candida albicans* biofilm. **Methods** Observe the inhibition effect of different concentrations litsea cubeba oil on yeast budding by serum germ tube experiments. **Results** 2—5 μL/mL litsea cubeba oil could thoroughly inhibit budding growth of *Candida albicans*, but haven't antiseptic effect, the inhibition rate of 0.25 μL/mL litsea cubeba oil on *Candida albicans* germ was 85.0%. **Conclusion** 2—5 μL/mL litsea cubeba oil could completely inhibit the budding growth of *Candida albicans*, but have no antiseptic effect. 0.25 μL/mL litsea cubeba oil could hardly inhibit the growth of buds.

Key words: litsea cubeba oil; *Candida albicans*; biofilm; serum gemma test

白色念珠菌生物被膜是一种黏附于有生命或无生命物质表面的微生物群落, 包裹于它们自身产生的细胞外基质(ECM)中, 是微生物在生长过程中为了适应生存环境而形成的一种与浮游菌相对应的存在形式^[1]。Hawser 等^[2]发现, 与浮游菌相比, 抑制生物被膜所需要的药物浓度要高出 5~8 倍, 最小抑菌浓度(MIC)增加了 30~20 000 倍。目前临床上尚无专门针对白色念珠菌生物被膜的 药物, 因此, 抑制生物被膜的形成对临床抗菌治疗意义重大。

山苍子又称山鸡椒、木姜子、山胡椒, 中药名为萆澄茄, 为樟科木姜子属植物, 山苍子精油是从山苍子中提炼出来的挥发油, 山苍子果实、花、叶、树皮均含有芳香油, 不同部位所含成分存在很大差异, 其中以果实的提取物最佳。山苍子精油化学成分复杂, 主要的有效成分为柠檬醛(60%~80%)和柠檬烯(15%)。研究表明, 山苍子精油具有广谱抗菌活性, 对真菌、细菌均有很好的抑制或杀菌作用^[3]。本文主要研究了山苍子精油对白色念珠菌生物被膜芽管形成阶段的抑制作用, 报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 收集从临床标本中分离的白色念珠菌 40 株, 转种于沙保罗斜面培养基上, 保存在-20℃冰箱。

1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养液: 用 RPMI-1640 干粉(Gibco)配置, 每 10 g RPMI-1640 溶解于 1 000 mL 蒸馏水, 用 NaOH 调节 pH 为 7.0±0.1, 0.22 μm 滤过膜过滤消毒, 4℃避光保存。酵母浸出粉蛋白胨葡萄糖培养基(YEPD)培养液:

酵母浸膏 10 g、蛋白胨 15 g、葡萄糖 20 g, 溶于 1 000 mL 蒸馏水, 高压灭菌, 4℃保存备用。结晶紫染液(珠海贝索)。山苍子精油是山苍子果实经水蒸气蒸馏提取出的黄色油状物, 柠檬醛含量为 60%~80%。

1.3 方 法

1.3.1 将冻存于沙保罗斜面培养基的菌株转种于 SDA, 35℃培养 24 h, 挑取单个菌落转种于 YEPD 液体培养基中, 35℃75 r/min 摇床培养 18 h。离心弃去上清液, 用 PBS 洗涤 3 次收集菌体备用。将灭菌盖玻片置于细胞培养板中, 取 2 mL 预先配好的浓度为 1×10⁷ cfu/mL 的菌液加入培养孔内, 空白对照组只加入等量不含细菌的 RPMI-1640 培养液, 37℃培养 24 h, 取出盖玻片在 PBS 中漂洗, 洗去浮游菌, 自然风干, 滴加结晶紫染液, 5 min 后漂洗, 肉眼观察是否有膜状物生成, 并在光学显微镜下观察其形态, 筛选能形成生物被膜的白色念珠菌。参照唐书谦等^[4]的方法, 用微量移液器取 1 mL 血清于液体培养管中, 然后分别加入 5、4、3、2、1、0.5、0.25 L 山苍子精油。阴性对照管为生理盐水与血清 1:1 混匀。将能形成生物被膜的白色念珠菌用生理盐水配成 4×10⁷ cfu/mL, 在加有山苍子精油的液体培养管中每管接种菌液 20 μL 并混匀, 置 35℃温箱孵育 3 h, 牛鲍计数板观察芽管生长现象。将无芽管生长的培养管, 分别取样接种于 SDA 平板, 25℃培养 24 h, 观察有无菌落生长。芽管生长的判断标准: 观察芽管数、芽管生长的长度与对照管比较, 超过菌体直径 2 倍以上为正常生长芽管; 无

芽管形成者,为芽管受抑制。用牛鲍计数板分别计算出不同浓度山苍子精油出现的正常芽管和受抑制芽管数量。判断标准:敏感,无芽管生长;中度敏感,芽管受抑制率为 50% 以上;轻度敏感,芽管受抑制率为 0~50%;耐药,与对照组芽管长度基本一致者。芽管长度和比率的判断由 2 位有经验的工作人员在镜下分别计数 100 个酵母细胞取均值。

2 结 果

40 株临床分离白色念珠菌中有 14 株可以形成生物被膜。观察 0.25~5 μ L/mL 不同浓度山苍子精油对 14 株白色念珠菌芽管生长的抑制作用,见表 1。将不同浓度山苍子精油作用于芽管生长呈阴性的培养管,取样接种于 SDA 平板,25 $^{\circ}$ C 培养 24 h 发现有菌落生长,说明浓度为 5、4、3、2 μ L/mL 的山苍子精油仅对白色念珠菌芽管有抑制生长作用,没有杀菌作用。

表 1 不同浓度山苍子精油对 14 株白色念珠菌芽管形成的抑制作用[n(%)]

山苍子精油 浓度(L/mL)	敏感	中度敏感	轻度敏感	耐药
5	14(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
4	14(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
3	14(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
2	14(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
1	1(7.1)	10(71.4)	3(21.4)	0(0.0)
0.5	0(0.0)	2(14.3)	9(64.3)	3(21.4)
0.25	0(0.0)	0(0.0)	2(14.3)	12(85.7)

3 讨 论

临床上生物被膜广泛存在于各种生物医学材料,诸如支架、假肢、分流器、气管内插管、起搏器、人工心瓣膜、静脉插管、导尿管等植入物表面^[5]。调查显示,60% 的 ICU 患者生物被膜相关感染是由于使用导管所致^[6],白色念珠菌在医院感染败血症中占 15%,其主要感染来源是医疗设备^[7]。研究表明白色念珠菌生物被膜的形成分为 4 个阶段:(1)酵母细胞的细胞壁蛋白质介导黏附于介质表面;(2)酵母细胞在表面生长成薄薄的一层细胞;(3)假菌丝、菌丝和细胞代谢产生的基质材料形成 ECM,组成成熟的生物被膜;(4)生物被膜上酵母细胞的传播可能导致其在身体各个部位的定植^[8]。因此,生物被膜形成的必经之路是黏附,阻止细胞黏附就能有效阻碍生物被膜的形成;同时抑制酵母细胞的出芽生长,可以使其无法形成坚固的生物被膜。

血清芽管试验是一种传统的方法,主要用于鉴定真菌,利用血清芽管实验可以判断山苍子精油是否能抑制白色念珠菌的出芽生长,从而阻断白色念珠菌生物被膜的初始形成阶段。若芽管不能形成则酵母细胞黏附不牢固,没有菌丝也不能交织成坚固的生物被膜。本研究显示,2~5 μ L/mL 的山苍子精油可以完全抑制白色念珠菌的出芽生长,但没有杀菌作用,0.25 μ L/mL 几乎不能抑制芽管生长。说明 2~5 μ L/mL 苍子精油可以抑制初始阶段生物被膜的形成,但不能杀灭真菌细胞。

生物被膜中的微生物和浮游状态有很大的不同,主要是药物难以有效地进入生物被膜对微生物起到抑制作用^[9],还有生物被膜中微生物在营养限制的条件下处于休眠状态^[10],代谢不活跃,因此抗菌药物起不到作用。另外,一些耐药基因的表

达也是其强耐药性的原因之一^[11],比如编码药物外排泵的基

参考文献

[1] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms; survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2): 167-193.

[2] Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of candida albicans biofilms to antifungal agents in vitro[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(9): 2128-2131.

[3] 方学军. 山苍子油的功能及应用[J]. 湖南林业科技, 2007, 34(3): 82-84.

[4] 唐书谦, 廖军, 钟白玉, 等. 白念珠菌芽管法药敏试验新方法[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(9): 825-827.

[5] Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials; a clinically significant problem [J]. FEMS Yeast Res, 2006, 6(7): 979-986.

[6] Lahbib SM. Assessment of the types of catheter infectivity caused by Candida species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria[J]. Int J Gene Med, 2013, 6(1): 1-7.

[7] Dominic RM, Shenoy S, Baliga S. Candida biofilms in medical devices: evolving trends [J]. Kathmandu Univ Med J(KUMJ), 2006, 5(3): 431-436.

[8] Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm; a fungal perspective[J]. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(6): 588-594.

[9] Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in Candida albicans biofilms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(7): 2454-2463.

[10] Lewis K. Persister cells; molecular mechanisms related to antibiotic tolerance [M]. Berlin German; Springer Berlin Heidelberg, 2012: 121-133.

[11] Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs[J]. Curr Opin Microbiol, 2002, 5(4): 379-385.

[12] White TC. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in Candida albicans isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(7): 1482-1487.

[13] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans; development, architecture, and drug resistance[J]. J Bacteriol, 2001, 183(18): 5385-5394.

[14] Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in Candida albicans[J]. Cell, 2012, 148(1/2): 126-138.