• 论 著 •

茶多酚联合万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜的影响*

胡艳军¹, 夏素琴^{1△}, 陈雨欣²

(1. 南京明基医院检验科, 南京 210019; 2. 南京鼓楼医院检验科, 南京 210008)

摘要:目的 探究茶多酚单用及其与万古霉素联合作用对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)生物膜的作用。方法 采用 96 孔聚丙烯细胞培养皿检测不同来源 MRSA 的生物膜形成能力,通过琼脂稀释法检测茶多酚对 MRSA 的抗菌活性,并观察测量茶多酚单用及其与万古霉素联合作用对 MRSA 生物膜的作用。结果 不同标本来源的 MRSA 均可在一定程度上形成生物膜(各组生物膜 A_{595} 为 0.64~1.15),其中伤口分泌物来源的菌株生物膜形成能力最强(A_{595} 为 1.15);茶多酚对 MRSA 有一定的抗菌活性,最低抑菌水平为 0.08~0.64 mg/mL;万古霉素可以一定程度降低 MRSA 的生物膜形成,茶多酚单用对生物膜消除影响较弱,但是二者联合使用可以增加生物膜形成。结论 茶多酚联合万古霉素可增加 MRSA 菌株生物膜的形成,提示临床治疗 MRSA 生物膜相关感染时,需注意茶多酚物质的影响。

关键词:茶多酚; 万古霉素; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 生物膜

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.20.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)20-2977-03

Effects of tea polyphenols and vancomycin on biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**HU Yanjun¹, XIA Suqin^{1△}, CHEN Yuxin²

(1. Department of Clinical Laboratory, Nanjing BenQ Hospital, Nanjing, Jiangsu 210019, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: Objective To explore the effects of tea polyphenols single use and its combined use with vancomycin on the biofilms of methicillin-resistant staphylococcus aureus(MRSA). **Methods** Ninety-six-hole polypropylene cell culture dish was adopted to detect the biofilm formation ability of different sources of MRSA, the antimicrobial activity of tea polyphenols against MRSA was detected by the agar dilution method, moreover the role of tea polyphenols single use and its combination with vancomycin on the biofilm formation was observed. **Results** The different sources of MRSA all formed the biofilms(average range 0.64-1.15 in each A_{595} group) in a certain degree, among them, the biofilm formation ability in the strains(A_{595} was 1.15) from the wound secretion was most strong; tea polyphenols had certain antibacterial activity to MRSA strains, the minimum inhibitory concentration range was 0.08-0.64 mg/mL; vancomycin could reduce the biofilm formation of MRSA to some extent, tea polyphenols single use had weaker impact on the biofilm elimination, but the combination use of the two materials could increase the biofilm formation. **Conclusion** Tea polyphenol combined with vancomycin can increase the biofilm formation of MRSA strains, prompting that clinic should pay attention to the effect of tea polyphenols when treating the MRSA biofilm related infection.

Key words: tea polyphenols; vancomycin; methicillin-resistant staphylococcus aureus; biofilms

金黄色葡萄球菌是医院和社区获得性感染最常见的病原菌之一,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的出现给临床治疗带来极大挑战,MRSA 可引起皮肤软组织感染、化脓性关节炎、肺炎、骨关节炎、心内膜炎等一系列疾病^[1-2]。细菌生物膜是指细菌在生长过程中附着于非生物或生物表面,由自身产生的胞外聚合物及其基质网包裹形成的三维结构的立体细胞群体,它可以降低抗菌药物对内部细菌的作用,导致耐药水平增加数百倍甚至数千倍,且能降低机体免疫细胞的吞噬作用^[3]。一旦发生金黄色葡萄球菌生物膜感染,将难以彻底治愈。近期研究发现茶多酚是茶叶中有药理和保健功能的主要成分之一,其抗微生物作用逐渐受到了重视^[4]。万古霉素是治疗 MRSA 相关感染的首选药物。本次研究主要探究茶多酚及万古霉素单用及联合治疗对不同来源的 MRSA 生物膜形成的影响。现报道如下。

1 材料与方

1.1 菌株来源 本次试验的菌株均来自 2014-2015 年南京

明基医院住院患者分离的金黄色葡萄球菌,标本来源为血液、尿液、痰、导管、伤口分泌物、脓液,各 30 株。所有菌株经 VITEK Compact 全自动型微生物鉴定仪鉴定确认,并根据药敏结果参照美国临床实验室标准协会 2016 标准选取 MRSA 菌株,质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC25923 购自于原卫生部临检中心。

1.2 仪器及试剂 本次试验使用的仪器主要有 VITEK Compact 全自动微生物鉴定及药敏仪(法国生物梅里埃公司生产);多功能微孔板检测酶标仪(美国 Biotek 公司生产),电子天平(上海恒平科学仪器有限公司生产);麦氏比浊仪(法国 bio-Merieux 公司生产)。主要试剂有:液体胰蛋白酶大豆肉汤培养基(TSB),水解酪蛋白(MH)培养基(英国 Oxid 公司生产),茶多酚,购自陕西藤迈生物科技有限责任公司(茶多酚水平约为 98.06%);万古霉素,购自美国辉瑞公司。肉汤培养基(LB)琼脂平板、磷酸盐缓冲液(PBS)等均为本实验室配制。

1.3 生物膜形成试验 采用 96 孔聚丙烯细胞培养皿结晶紫

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81600201)。

作者简介:胡艳军,女,主管技师,主要从事微生物检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:qin.xia@benqmedicalcenter.com。

染色法测定菌株体外生物膜形成能力。简要过程如下:首先用接种环挑取分纯滴单个菌落于 5 mL TSB 培养基中, 35 °C 120 r/min 振荡培养 18 h。吸取 10 μL 菌液至新鲜的 5 mL TSB 培养基中进行亚培养。接下来将亚培养后获得的菌液用 TSB 培养基调至 0.5 麦氏浊度, 然后吸 10 μL 菌液加入到含有 190 μL TSB 培养基的 96 孔细胞培养板内, 作为隐性对照; 35 °C 恒温静置培养 24 h 后进行生物膜的测定。去除上层浮游菌, 在风干后加入 200 μL 结晶紫染液, 染色冲洗后, 室温下风干, 每孔各加 200 μL 无水乙醇, 用酶标仪测定其在 595 nm 波长下的吸光度(A)值。

1.4 茶多酚体外抑菌试验

1.4.1 检测最低抑菌水平(MIC) 采用试琼脂稀释法测量茶多酚对 MRSA 的 MIC, 同时测定其对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC 作为空白对照组。简要操作过程如下: 配置一系列倍比稀释的茶多酚溶液 2 mL。分别将其加入到高压灭菌后冷却至 50 °C 的 MH 溶液中, 倒入直径为 90 mm 平板内, 待凝固后备用。调整菌液水平为 0.5 麦氏水平, 稀释 10 倍后, 用多头接种仪吸取 1~2 μL 菌液接种在上述平板上, 置 35 °C 恒温环境中孵育 16~20 h。观察菌落生长情况, 无菌落生长的平板所含的茶多酚水平即为茶多酚对该菌的 MIC 值。

1.4.2 生物膜抑制试验 选取上述试验中生物膜形成能力较强的菌株及 ATCC29213 菌株作为对照。在上述生物膜培养基中加入不同水平(0.08~1.28 mg/mL)茶多酚溶液, 不同水平(0.125~2.000 mg/L)的万古霉素溶液及茶多酚与万古霉素混合溶液, 作为试验组; 每株菌同时做 3 个复孔, 在最后 3 个孔中仅加入 200 μL LB 作为空白对照组。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行统计学处理。对不同组的生物膜吸光度 A₅₉₅ 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 t 检验比较。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同来源生物膜形成能力 各种临床标本分离的 MRSA 菌株均可以形成一定程度的生物膜, 其中从伤口分泌物分

离的菌株生物膜形成能力相对较强, A₅₉₅ 为 1.15; 其次为来源于尿液、导管和血液的菌株, A₅₉₅ 分别为 0.94、0.91、0.86。相比来说来源于痰液及脓液的菌株生物膜形成能力相对较弱, A₅₉₅ 值分别为 0.81、0.65, 其中脓液标本来源菌株生物膜形成量与伤口来源菌株生物膜形成量比较差异有统计学意义(P<0.05)。

2.2 茶多酚提取物对 MRSA 菌株 MIC 测定 180 株金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 0.08~0.64 mg/mL, 均值为 0.22 mg/mL。表明茶多酚对 MRSA 菌株有一定的抗菌活性。

2.3 不同水平茶多酚溶液及万古霉素溶液对生物膜的影响比较 见表 1, 不同水平的茶多酚对细菌的生物膜均有一定的影响, 总体趋势为随着水平的增加, 生物膜形成量逐渐减少。但当茶多酚水平大于其 MIC 水平(0.32 mg/mL)后, 对生物膜的消除作用并不明显, 尤其需要注意的是当水平为 1/2MIC 时, 茶多酚对生物膜并没有消除作用, 甚至会增加生物膜的形成。万古霉素对该菌的生物膜有一定的消除作用, 药物水平为 MIC 水平 0.5 mg/L 时, 生物膜形成量与空白对照组相比, 有一定的下降。而当药物水平达到 4 倍的 MIC 时, 生物膜消除作用明显增强。

2.4 茶多酚与万古霉素药物联合作用对金黄色葡萄球菌生物膜的影响比较 茶多酚对不同水平万古霉素消除生物膜的影响, 见表 2。茶多酚与 MIC 万古霉素水平共同作用时, 生物膜形成量比单独使用万古霉素对照组增加了 23.81%, 在 2MIC 万古霉素水平时, 生物膜形成量比单独使用万古霉素对照组增加了 1.03 倍, 在 4MIC 万古霉素水平时, 生物膜形成量比单独使用万古霉素对照组增加了 1.87 倍。随着茶多酚水平的增加, 生物膜形成量逐渐增加。当水平 > 1/2MIC 茶多酚溶液时, 其与万古霉素共同作用生物膜, 生物膜形成量比单独万古霉素作用后生物膜形成量开始增加。当水平达到 4MIC 茶多酚水平时, 其比单独使用万古霉素生物膜形成量增加了 27.27%。

表 1 不同水平茶多酚及万古霉素溶液对生物膜影响比较($\bar{x} \pm s$, mg/mL)

种类	空白对照组	1/4 MIC	1/2 MIC	MIC	2 MIC	4 MIC
茶多酚	1.75±0.18	1.69±0.13	1.77±0.12	1.65±0.22	1.63±0.21	1.67±0.12
万古霉素	1.75±0.18	1.49±0.20	1.30±0.18	1.08±0.18*	0.59±0.18*	0.30±0.23*

注: 与空白对照组对比, * P<0.05

表 2 茶多酚与万古霉素药物联合作用对金黄色葡萄球菌生物膜的影响比较($\bar{x} \pm s$, mg/mL)

种类	空白对照组	1/4 MIC	1/2 MIC	MIC	2 MIC	4 MIC
万古霉素	1.65±0.21	1.58±0.19	1.53±0.20	1.29±0.21*	1.24±0.17*	0.90±0.21*
茶多酚	1.10±0.16	1.05±0.18	1.12±0.20	1.18±0.18	1.20±0.11	1.40±0.08*

注: 与空白对照组对比, * P<0.05

3 讨 论

生物膜是金黄色葡萄球菌重要的毒力因素之一, 形成生物膜后常导致迁延性感染, 金黄色葡萄球菌不仅可在静脉导管、呼吸导管等非生命体表面形成生物膜从而导致严重的感染, 还可以在人体体表、伤口中形成生物膜^[5]。细菌生物膜的形成一般受到双组分调控系统(agr 系统)的调节, 该系统会通过感知环境的变化而调节生物膜的形成^[6]。本次试验中发现导管和

伤口分离的金黄色葡萄球菌生物膜形成能力较强, 可能与该菌所处的环境有关, 金黄色葡萄球菌 agr 系统通过调控 ica 操纵子表达的细菌表面黏附因子的多少, 从而调节生物膜形成能力。在导管及伤口环境下, 该系统会通过上调 ica 操纵子的表达从而加强菌株的黏附作用。而在脓液或痰液中, agr 系统则会调控细菌毒力相关操纵子发挥作用, 通过分泌的毒力蛋白, 进而侵袭宿主。值得注意的是, 本次研究采取的菌株由于经

过-80℃冰箱的保存,是否对细菌生物膜形成造成影响还不清楚。

近年来由生物膜导致的感染逐渐增加,据报告,美国大型医院里有超过 65% 的感染与生物膜相关,导致的治疗花费每年超过 10 亿美元^[7]。我国医院 MRSA 生物膜相关感染率也在逐渐升高,如何有效治疗由生物膜引起的相关感染已成为临床亟待解决的问题。茶多酚是茶叶中常见的多酚类物质,广泛存在于自然界,易提取;且在 1997 年被列为中成药原料,1989 年被中国食品添加剂协会列入 GB2760-89 食品添加剂^[8]。本次研究发现茶多酚有较强的抗 MRSA 作用,表明可以进一步研究其作为治疗多重耐药菌的物质,这与钱丽红等^[9]的研究成果类似。

本次研究发现单独使用茶多酚作用于生物膜时,其对生物膜消除作用并不明显,值得注意的是,1/2 MIC 水平茶多酚作用后生物膜甚至增加,多次重复试验发现不同水平茶多酚对生物膜影响不同,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。单独使用万古霉素对生物膜有一定的消除作用,但是茶多酚联合万古霉素作用于生物膜的时候,万古霉素对生物膜的消除作用降低,随着茶多酚水平的增加,甚至会促进生物膜的形成。这一现象产生的原因并不清楚,可能是茶多酚与万古霉素相互拮抗所致,还需要进一步研究。本试验与李新军等^[10]报道的茶多酚会降低生物膜形成结果不同,主要原因是上述研究采用的菌株为肠球菌,其与金黄色葡萄球菌的生物膜主要成分不同。

MRSA 对多种抗菌药物耐药,且生物膜形成能力较强,医疗工作者及科研人员正在努力寻找各种药物或物质来预防和治疗该菌株的感染。目前许多科研人员关注从自然界中发现抗菌物质,本次研究表明虽然物质有较强的抗菌活性,但还应该关注其对菌株生物膜形成的影响,另外提示临床治疗 MRSA 菌株引起的生物膜相关感染时应注意含有茶多酚的物质对药物治疗的影响。

参考文献

[1] Montanaro L, Testoni F, Poggi A, et al. Emerging pathogenetic mechanisms of the implant-related osteomyelitis

(上接第 2976 页)

参考文献

[1] 张立娟,孙树荣,武佳蕾.血清胱抑素 C 在老年性急性肾损伤患者中早期诊断价值的研究[J]. 检验医学与临床, 2016,13(9):1158-1160.
 [2] 周睿,王清涛.医学试验室认可中关于方法学性能验证的高频问题及应对[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(12): 885-887.
 [3] 何国坚,肖庆,韦庆文.电化学发光免疫分析法检测维生素 D 试剂盒性能验证[J]. 中国医药指南, 2014, 12(23): 76-77.
 [4] 徐丽萍. C 反应蛋白试剂性能验证的试验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(22): 3061-3062.
 [5] 王卫才. 乙肝表面抗原酶联免疫试剂性能验证[J]. 国外医学医学地理分册, 2015, 36(3): 227-229.
 [6] 黄回滨,张洋,王欣欣,等. 液态酶法糖化血清蛋白试剂性能评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(11): 1149-

by Staphylococcus aureus[J]. Int J Artif Organs, 2011, 34(9): 781-788.
 [2] 陈衍,俞云松. 加强我国社区相关性耐甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌等研究[J]. 中华临床感染病杂志, 2016, 9(4): 294-298.
 [3] Tan SY, Chew SC, Tan SY, et al. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms[J]. Curr Opin Biotechnol, 2014, 26(2): 1-6.
 [4] 王丽,许奇,徐顺,等. 茶多酚对微生物生长影响对研究进展[J]. 现代食品科技, 2013, 29(7): 1737-1741.
 [5] Fuente-Nunez LC, Korolik V, Brains M, et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(5): 2696-2704.
 [6] Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from catheterized patients with urinary infection[J]. Microb Pathol, 2016, 98: 69-76.
 [7] Price BL, Lovering AM, Bowling FL, et al. Development of a novel collagen wound model to simulate the activity and distribution of antimicrobials in soft tissue during diabetic foot infection[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(11): 6880-6889.
 [8] 中国质检出版社. 食品安全国家标准食品添加剂使用标准: GB 2760-2011[M]. 北京: 中国质检出版社, 2011: 7-8.
 [9] 钱丽红,陶妍,谢晶. 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1628-1633.
 [10] 李新军,郭晓丽,孙应明,等. 茶多酚、MTAD 和次氯酸钠液抑制粪肠球菌及其生物膜的作用比较[J]. 牙体牙髓牙周学杂志 2011, 17(3): 2112-2116.

(收稿日期:2017-02-24 修回日期:2017-05-02)

1155.
 [7] 高玲娟,陈晨. 25-羟基维生素 D 检测试剂盒的性能验证[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(21): 3640-3642.
 [8] 陈芳芳,李家亮,王国洪. BECKMAN Dxl 800 全自动化学发光仪甲状腺检测项目的性能验证[J]. 东南国防医药, 2013, 15(6): 585-587.
 [9] 朱薇,王丽娜,王静,等. 同型半胱氨酸检测试剂与厂家声明一致性验证[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(1): 41-42.
 [10] 曹云友,姜玉禄. 胱抑素 C 与其他标志物对早期糖尿病肾病中的诊断效能[J]. 现代预防医学, 2015, 42(14): 2669-2671.
 [11] 于利萍,石正洪. 血清胱抑素 C 水平在缺血性卒中患者急性期及其亚型中的变化和意义[J]. 中国脑血管病杂志, 2016, 13(4): 191-197.

(收稿日期:2017-02-29 修回日期:2017-05-08)