

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.16.016

没食子水提取物对钛表面念珠菌生物膜的抑制作用*

高鹏¹, 李恺¹, 张若冰², 艾林^{1△}

(1. 中国人民解放军空军军医大学第九八六医院, 陕西 西安 710054; 2. 陕西省药品监督管理局, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 探讨没食子提取物对钛表面的白色念珠菌生物膜和白色念珠菌与光滑念珠菌共培养生物膜的抑制作用。方法 使用人工唾液对钛盘面进行预处理,并在钛盘面上形成单种白色念珠菌生物膜和白色念珠菌与光滑念珠菌共培养生物膜。试验分为阴性对照组、试验组和阳性对照组,分别使用0.9%氯化钠溶液、没食子水提取物和氯己定浸润生物膜标本。测定生物膜代谢活性、细胞活力和表面粗糙度。结果 与阴性对照组比较,试验组与阳性对照组的2种生物膜的细胞活力、代谢活性均显著减弱($P < 0.05$),生物膜表面粗糙度显著增强($P < 0.05$)。结论 没食子提取物具有抗牙齿表面生物膜的活性作用,是治疗种植体周围炎的可行选择。

关键词:没食子水提取物;生物膜;念珠菌;种植体周围炎

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)16-0062-03

Inhibitory Effect of Gallic Water Extract on Candida Biofilm on the Surface of Titanium

GAO Peng¹, LI Kai¹, ZHANG Ruobing², AI Lin¹

(1. Department of Stomatology, No. 986 Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, China 710054; 2. Shaanxi Medical Products Administration, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of gallic extract on *Candida albicans* biofilm and co-culture biofilm of *Candida albicans* and *Candida glabrata* on the surface of titanium. **Methods** The surface of titanium disk was pretreated with artificial saliva, and the *Candida albicans* biofilm and co-culture biofilm of *Candida albicans* and *Candida glabrata* were formed on the surface of titanium disk. The test was divided into negative control group, test group and positive control group. Biofilm samples were soaked with 0.9% sodium chloride solution, gallic water extract and chlorhexidine respectively. The metabolic activity, cell viability and surface roughness of biofilm were measured. **Results** Compared with those in the negative control group, the cell viability and metabolic activity of the two biofilms decreased significantly ($P < 0.05$), while the surface roughness of the two biofilms increased significantly in the test group and the positive control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Gallic extract has antifungal activity against *Candida* biofilm on the surface of teeth, which is a feasible choice for the treatment of peri-implant inflammation.

Key words: gallic water extract; biofilm; *Candida*; peri-implant inflammation

种植体周围炎为生物膜依赖性疾病,其始动因素通常为生物膜,其中的致病微生物主要包含牙周致病菌(牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌)、糖化细菌(变形链球菌、血链球菌)和真菌(念珠菌)^[1-2]。种植体周围生物膜中约30%的微生物为念珠菌属真菌^[3]。含有大量致病菌的生物膜会导致种植体脱落,而使手术失败。目前,种植体周围炎的治疗主要包括碳纤维牙周器械刮治、超声波洁治等物理疗法,效果均欠佳^[4]。使用抗菌漱口水是临床最普遍的维护方法^[5],其中氯己定漱口水为常规治疗药物^[6],但长时间使用会产生黏膜损伤、牙齿和黏膜染色、味觉退化、口干等不良反应^[7]。故寻找具有抗菌能力强、副作用少的生物活性分子和天然产物成为近年来种植体周围炎预防的研究热点。没食子为中医常用药材^[8],其性寒、味苦,有固涩、收敛、燥湿、止血作用,已被证明具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化和抗菌活性^[9]。其有效成分主要为提取物中的没食子鞣质、没食子酸、没食子酸烷基酯等。没食子临床已用于制备漱口水和义齿清洁剂,治

疗生物膜依赖性疾病,但没食子提取物对种植体周围微生物环境的影响尚未明确。本研究中评估了没食子水提取物对钛表面黏附的白色念珠菌生物膜和其与光滑念珠菌共培养生物膜的抑制作用,为没食子在种植术后维护的临床应用提供理论基础。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与菌株

仪器:Objet30 OrthoDesk 3D打印机(以色列 Stratsys 公司);752型紫外-可见分光光度仪、倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Form Talysurf series 轮廓分析仪(英国 Taylor Hobson 公司)。

试剂:没食子药材(新疆奇康哈博维药有限责任公司,批号为20161112);氯己定漱口水(南粤药业有限公司,批号为20210123);RPMI 1640培养基、DMEM培养基、四氮唑盐(MTT)试剂盒(美国 Sigma 公司);沙氏葡萄糖肉汤培养基(SDB, USP 标准,德国 Merck KGaA 公司)。

菌株:白色念珠菌(ATCC 90028)、光滑念珠菌

*基金项目:2020年度军队后勤科研项目[CKJ20J027]。

第一作者:高鹏,女,大学本科,研究方向为口腔生物学,(电子信箱)26797975@qq.com。

△通信作者:艾林,男,博士研究生,副主任医师,研究方向为口腔生物学、口腔生物力学,(电子信箱)173861355@qq.com。

(ATCC 2001),均由空军军医大学口腔内科学实验室提供。

1.2 方法

生物膜培养:复苏白色念珠菌和光滑念珠菌,在 37 °C 温度条件下的 SDB 培养基上进行有氧培养。再将细胞悬浮液(细胞密度 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)在 RPMI 1640 培养基中培养 24 h,5 000 r/min 离心 5 min,用无菌 0.9% 氯化钠溶液洗涤 2 次,转移至 RPMI 1640 培养基中。

标本制备与分组:使用 3D 打印机制备钛盘(1.3 cm × 0.2 cm),并用研磨膏和陶瓷颗粒抛光 12 h。用 75% 乙醇清洗钛盘,高温(121 °C)、高压(1.1 bar)灭菌 20 min。将样本分为 3 组,各 12 例。试验组为 10 μmol/L 没食子水提物,阳性对照组为氯己定漱口水,阴性对照组为无菌 0.9% 氯化钠溶液。

标本处理:将没食子药材粉碎为粗粉,加水(质量比 1:5)浸泡 4 h,煎煮 3 次,并分别滤过,每次 1 h,合并煎液后滤过;真空干燥为浸膏后称定质量,分装,待用。将钛盘标本浸入人工唾液(含 1% 羧甲基、0.008 4% 氯化钠、0.12% 氯化钾、0.034 2% 磷酸钾及 0.014 6% 氯化钙)中诱导形成唾液膜,置 24% 氯化镁溶液中,24 °C 温度条件下孵育 30 min。将 RPMI 1640 培养基(细胞密度 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)制成的微生物细胞悬浮液分别与 RPMI 1640 培养基(10 倍稀释液)混合培养,在钛盘面上形成单种白色念珠菌生物膜和白色念珠菌与光滑念珠菌共培养生物膜,37 °C 微需氧环境(用 1 个带蜡烛的厌氧罐来减少氧气含量)下孵育培养 24 h,后分离细胞悬液,将钛盘标本用 0.9% 氯化钠溶液冲洗 2 次。从生物膜形成起 24,48,72 h 将钛盘标本置合成溶液中,培养基每 24 h 更换 1 次。在每个时间节点末,将样本浸入 3 组受试物质中,并保持接触 10 min。然后使用无菌 0.9% 氯化钠溶液清洗 2 次,更新培养基,然后在 37 °C 微氧条件下继续孵育培养。96 h 时检测样本。

细胞活力分析:将样本转移到含有 1 mL 无菌 0.9% 氯化钠溶液的试管中,在搅拌器中搅拌 1 min 后对样本进行连续稀释,制成系列稀释液,并确定活菌的含量($10^{-1} \sim 10^{-6}$)。取 10 μL 进行等分样本,并分 3 份接种在 SDB 培养基上,37 °C 温度条件下培养 48 h,读取菌落计数。计数活细胞数并乘以连续稀释值。数据以每 1 mL 的菌落数(cfu/mL)表示。

细胞代谢测定:采用 MTT 法。在 37 °C 温度条件下含有 10% MTT 的 600 μL 培养基中避光孵育培养 4 h。去除上清液,并加入 600 μL 异丙醇酸后进行样品均质。收集上清液,在 570 nm 波长处检测吸光度。

表面粗糙度分析:使用轮廓分析仪评估钛盘标本生物膜的表面粗糙度,生物膜的复杂性和厚度与表面粗糙度呈正相关。将生物膜置 2.5% 戊二醛水溶液中 24 h,并通过增加乙醇循环(50% ~ 100%)在室温下脱水。20 倍放大倍率下分别对钛盘标本的上面、侧面进行表面粗糙

度测量(3 倍速度)。以表面无生物膜作基线对照。

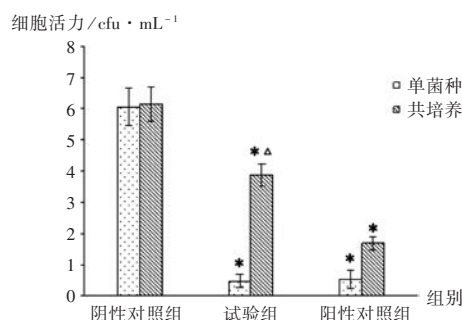
1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.00 统计学软件分析。对细胞计数进行对数变换,以便于统计。统计分析采用单因素方差分析和 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物学活性检测

生物膜细胞活力检测结果见图 1。氯己定和没食子水提物对单菌种及共培养生物膜均有抑制作用($P < 0.05$),对于共培养生物膜,氯己定的抑制作用更强($P < 0.05$)。生物膜代谢活性检测结果见图 2。可见,氯己定和没食子水提物均可显著降低单菌种及共培养生物膜的代谢,但两者无显著差异($P > 0.05$)。



注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,

Δ $P < 0.05$ 。图 2 同。

图 1 生物膜细胞活力

Note: Compared with those in the negative control group, * $P < 0.05$; compared with those in the positive control group, Δ $P < 0.05$; as well as Fig. 2.

Fig. 1 Cell viability of biofilm

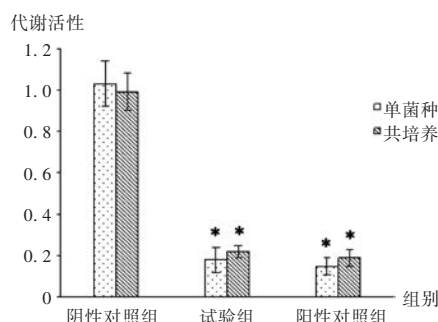


图 2 生物膜细胞代谢活性

Fig. 2 Metabolic activity of biofilm

2.2 表面粗糙度检测

结果见图 3。可见,在白色念珠菌的单种生物膜中,阳性对照组与试验组样本的表面粗糙度与基线比较无显著差异($P > 0.05$),但与阴性对照组比较有显著差异($P < 0.05$)。对于共培养生物膜,阳性对照组标本与基线比较无显著差异($P > 0.05$),但与阴性对照组和试验组比较有显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来,随着口腔种植手术的广泛推广,种植体得

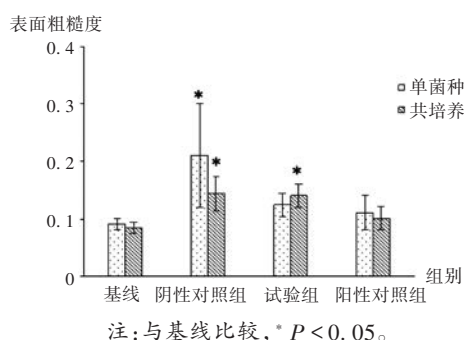


图3 生物膜表面粗糙度

Note: Compared with those at the baseline, * $P < 0.05$.

Fig. 3 Surface roughness of biofilm

到了大规模应用,术后并发种植体周围炎的数量逐年增长,目前的治疗方案主要包括化学和机械干预^[10],以及天然产物的应用。

局部使用抗菌药物是防止生物膜发生、发展的有效方法,特别是对于难清洁的口内区域(如种植体周围部位)。氯己定溶液虽已被广泛用于口腔生物膜控制,但其对黏膜的毒性作用影响了其长期使用^[11]。合理的口内抗菌药物在实施抗菌治疗时不能影响细胞增殖,并在控制感染的同时不能对深层组织造成严重损害。没食子水提物是本课题组长期研究的中药物质,其具有固涩、收敛、燥湿、止血作用,以及抗炎、抗肿瘤、抗氧化和抗菌活性。其有效成分中的鞣质具有抗炎活性,是制作漱口水的必要条件^[11]。本研究使用了自制的没食子水提物,并充分考虑了稀释的浓度及吞咽后口腔中可能的稀释度。

研究显示,没食子对葡萄球菌、内氏放线菌、部分革兰阴性菌等微生物均有抑制作用^[12]。本研究结果表明,没食子水提物可显著抑制白色念珠菌单种生物膜中的细胞活力,且明显强于共培养生物膜的抑制效果,说明没食子对不太复杂的生物膜的潜在抑制效果更好,这可能是由于成分简单的生物膜具有较低的细胞黏附和增殖能力,因此抗菌物质可更好地抵达生物膜细胞中。本研究结果表明,没食子与氯己定的抑菌效果相似,但何种天然植物化学物质与抗菌活性有关,以及没食子对不同细胞系和组织共培养的影响均需进一步研究。

生物膜表面粗糙度检测结果表明,没食子水提物和氯己定降低生物膜细胞活力和代谢活性的效果均较好。本研究结果显示,化学清洗液并不能完全有效地对钛盘标本表面消毒,即使在连续的抗菌溶液清洗后,仍存在部分残留的生物膜,但清洗过程有助于减少微生物负荷。在本研究条件下,没食子水提物降低了生物膜负荷和活性,可降低体内生物膜失衡的风险。

本研究中通过细菌黏附到钛盘表面的体外模型来模拟种植体周围的单种白色念珠菌和白色念珠菌及光滑念珠菌的共培养生物膜,评估控制种植体周围生物膜

的天然中药制剂的潜力。复杂的混合生物膜可能会对抗菌溶液的效果产生影响,因此复杂生物膜的组成必须考虑微生物间不存在拮抗关系,故设计使用了具有协同行为的共培养生物膜^[13]。本研究结果显示,没食子水提物具有沿着细胞外基质的扩散能力,并具有抗真菌作用,具有治疗种植体周围炎的潜力。

综上所述,没食子水提物具有抗生物膜活性,表明其具有治疗植入物周围炎的潜力。该研究结果可对中草药的进一步探索提供方向,未来的研究需在更复杂的生物膜和体内环境下分析没食子的抗生物膜作用。

参考文献

- [1] EPHROS H, KIM S, DEFALCO R. Peri-implantitis: Evaluation and Management[J]. Dent Clin North Am, 2020, 64(2): 305-313.
- [2] AL-SABBAGH M, SHADDOX LM. Is Peri-Implantitis Curable? [J]. Dent Clin North Am, 2019, 63(3): 547-566.
- [3] BERGLUNDH T, JEPSEN S, STADLINGER B, et al. Peri-implantitis and its prevention[J]. Clin Oral Implants Res, 2019, 30(2): 150-155.
- [4] SAHRMANN P, GILLI F, WIEDEMEIER DB, et al. The Microbiome of Peri-Implantitis: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Microorganisms, 2020, 8(5): 661.
- [5] DE AVILA ED, VAN OIRSCHOT BA, VAN DEN BEUCKEN J. Biomaterial-based possibilities for managing peri-implantitis[J]. J Periodontol Res, 2020, 55(2): 165-173.
- [6] OPSTRUP MS, JEMEC G, GARVEY LH. Chlorhexidine Allergy: On the Rise and Often Overlooked[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2019, 19(5): 23.
- [7] SO YL, SI YL. Susceptibility of Oral Streptococci to Chlorhexidine and Cetylpyridinium Chloride[J]. Biocontrol Sci, 2019, 24(1): 13-21.
- [8] SANTOS MG, HANSON P, MAIA VC, et al. A Review of Galls on Ferns and Lycophytes[J]. Environ Entomol, 2019, 48(1): 53-60.
- [9] JIA M, LI Q, HUA J, et al. Phytohormones Regulate Both "Fish Scale" Galls and Cones on Picea koraiensis[J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 580155.
- [10] BOLTON L. Chlorhexidine Patient Bathing Prior to Arthroplasty[J]. Wounds, 2018, 30(7): 213-215.
- [11] PATEL S, RAUF A, KHAN H. The relevance of folkloric usage of plant galls as medicines: Finding the scientific rationale[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 240-247.
- [12] TAKEDA S, YOZA M, AMANO T, et al. Comparative transcriptome analysis of galls from four different host plants suggests the molecular mechanism of gall development[J]. PLoS One, 2019, 14(10): e223686.
- [13] KADKHODA Z, AMARLU Z, ESHRAGHI S, et al. Antimicrobial effect of chlorhexidine on Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilms associated with peri-implantitis[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2016, 10(3): 176-180.

(收稿日期: 2021-02-15)