

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.21.025

[http://www.crter.org]

许颖, 吕庆, 康梁, 张慧明. 根管充填材料加入茶多酚抑制白色念珠菌生物膜的生成[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(21):3983-3990.

## 根管充填材料加入茶多酚抑制白色念珠菌生物膜的生成

许颖<sup>1</sup>, 吕庆<sup>1</sup>, 康梁<sup>2</sup>, 张慧明<sup>3</sup>

1 佳木斯大学附属口腔医院牙体牙髓病二科, 黑龙江省佳木斯市 154002

2 佳木斯大学附属口腔医院修复一科, 黑龙江省佳木斯市 154002

3 佳木斯大学生命科学实验中心, 黑龙江省佳木斯市 154007

### 文章亮点:

1 此问题的已知信息: 白色念珠菌生物膜是一种可黏附并生长于根管充填材料具有高度耐药特性的膜样生物集落, 其在根管内形成生物膜结构, 对外界因素有较强抵抗作用, 可造成根管治疗失败和根管内感染源的持续存在, 对患者产生不良的影响。

2 文章增加的新信息: 为深入了解白色念珠菌生物膜的相关特征, 首先应该对其形成的生物膜进行形态学观察, 文章通过体外形成白色念珠菌生物膜结构, 观察白色念珠菌生物膜形成过程中不同时期形态特征。根管充填材料加入茶多酚对白色念珠菌生物膜具有抑制作用, 为临床治疗根管内白色念珠菌感染的牙周病和难治性根尖周感染性疾病提供理论依据。

3 临床应用的意义: 白色念珠菌生物膜高度耐药的特点使临床根管充填治疗遇到阻碍, 其耐药的机制尚未完全弄清楚, 这方面的研究还有待深入, 而在根管充填材料中加入茶多酚对白色念珠菌生物膜抑制作用方面的研究, 还需要通过更多的体内和临床实验来验证。

### 关键词:

生物材料; 生物材料临床实践; 白色念珠菌; 生物膜; 耐药性; 细菌; 茶多酚; 茶色素; 根管充填材料; 性能; 根管糊剂; 抑菌药物; 抑菌作用; 口腔疾病; 聚合酶链反应; 基因型

### 摘要

**背景:** 白色念珠菌生物膜是根管充填治疗预后的影响因素, 茶多酚体外可能对白色念珠菌生物膜有抑菌作用, 其抑菌机制可能通过影响或干扰相关耐药基因的表达而实现。

**目的:** 探讨根管充填材料加入茶多酚对白色念珠菌生物膜的抑制作用。

**方法:** 采用常量肉汤稀释法确定茶多酚体外对白色念珠菌生物膜的最小抑菌浓度, 以此判断抑菌效果, 然后用逆转录聚合酶链反应方法检测白色念珠菌耐药基因 CDR1、CDR2 和 MDR1 受茶多酚作用后的表达水平的变化。

**结果与结论:** 茶多酚对白色念珠菌生物膜的最小抑菌浓度为 11.5 g/L, 反转录聚合酶链反应结果表明, 相关耐药基因 CDR1、CDR2 的表达水平随着药物浓度的梯度增加而降低, 在浓度为 23 g/L 及更高时 mRNA 的表达水平受到完全抑制, 而药物浓度变化对耐药基因 MDR1 的表达影响较小。茶多酚体外对白色念珠菌生物膜起到了抑制作用, 并对实验所选相关耐药基因 CDR1、CDR2 的表达过程明显产生了抑制作用。

## Root canal filling material added with tea polyphenols inhibits the generation of *Candida albicans* biofilm

Xu Ying<sup>1</sup>, Lü Qing<sup>1</sup>, Kang Liang<sup>2</sup>, Zhang Hui-ming<sup>3</sup>

1 Second Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China

2 First Department of Prosthodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China

许颖, 女, 1960年生, 汉族, 哈尔滨医科大学毕业, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事牙体牙髓病学研究。

xuyingjiayi@126.com

通讯作者: 吕庆, 硕士, 佳木斯大学附属口腔医院牙体牙髓病二科, 黑龙江省佳木斯市 154002  
lq861229@126.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)21-03983-08

收稿日期: 2012-12-18

修回日期: 2013-03-27

(20121213009/YL · C)

Xu Ying, Professor, Master's supervisor, Second Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China  
xuyingjiayi@126.com

Corresponding author: Lü Qing, Master, Second Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China  
lq861229@126.com

Received: 2012-12-18

Accepted: 2013-03-27

3 Experimental Center of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** *Candida albicans* biofilms can influence the prognosis of root canal filling, and tea polyphenols can *in vitro* inhibit the *Candida albicans* biofilm, while the antibacterial mechanism may play the role through influencing or interfering the expression of resistance gene.

**OBJECTIVE:** To investigate the inhibitory effect of root canal filling material added with tea polyphenols on *Candida albicans* biofilm.

**METHODS:** Constant broth dilution method was used to determine the minimal inhibitory concentration of tea polyphenols *in vitro* inhibited *Candida albicans* biofilms, in order to identify the inhibitory effect. Then the expressions of *Candida albicans* resistance genes CDR1, CDR2 and MDR1 were detected with reverse transcriptase polymerase chain reaction after inhibited with tea polyphenols.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The minimum inhibitory concentration of tea polyphenols used to inhibit *Candida albicans* biofilm was 11.5 mg/mL. Reverse transcriptase polymerase chain reaction results showed that expressions of related resistance genes CDR1 and CDR2 were decreased with the gradient increasing of drug concentration, and when the concentration reached to 25 mg/mL or above, the mRNA expression level was completely inhibited, while the concentration of the resistance drug has less effect on the expression of resistance drug MDR1. Tea polyphenols has inhibitory effect on *Candida albicans* biofilm, and has significant inhibitory effect on the expressions of experimental selected resistance genes CDR1 and CDR2.

**Key Words:** biomaterials; biomaterial clinical practice; *Candida albicans*; biofilm; drug resistance; bacteria; tea polyphenols; tea pigment; root canal filling material; performance; endodontic sealers; antibacterial drugs; antibacterial effect; oral diseases; polymerase chain reaction; genotype

Xu Y, Lü Q, Kang L, Zhang HM. Root canal filling material added with tea polyphenols inhibits the generation of *Candida albicans* biofilm. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(21): 3983-3990.

## 0 引言

牙髓病及根尖周病是根管内多种微生物混合感染引起的一种口腔常见疾病。常规的根管治疗,可以使牙髓病及根尖周病变炎症缓解和改善<sup>[1-2]</sup>。根管系统的充填治疗,一方面是消除死腔和炎症原发病,预防微生物的进入,阻断再感染的途径;另一方面是材料本身对根尖周组织的病变有恢复作用,并且促进根尖孔的钙化闭合<sup>[3]</sup>。根管治疗过程中,根管预备、消毒固然重要,但根管充填材料更是根管治疗能否成功的关键。成功的根管治疗是用生物相容性良好的充填材料对根管系统进行完善的充填,根管充填材料的性能又直接影响根管充填的完善程度。

理想的根管充填材料应具备的性能包括<sup>[4-5]</sup>: ①无气孔且不可渗透。②不刺激根尖组织。③体积稳定不收缩,凝固后与根管壁无间隙。④能长期保存在根管中而不被组织液破坏、溶解或吸收。⑤不使牙体或牙龈变色。⑥具有X射线阻射,便于检查根管是否充满及根管充填材料吸收情况<sup>[6]</sup>。⑦操作简单,便于充入根管,有充分的充填时间,如有必要,容易从根管中取出。⑧根管充填后能抑菌,有持续的消毒作用。

根管充填材料的抑菌作用是影响根管治疗预后的关键,但由于根管生物膜的存在,根管内感染无法彻底清除。近几年来研究发现白色念珠菌生物膜的存在是根管治疗失败的根源之一<sup>[7]</sup>。根管生物膜的存在是牙髓感染性疾病久治不愈、根管充填治疗失败的重要原因。慢性根尖周炎根管内白色念珠菌可以生物膜式存在根管内,与顽固性根尖炎密切相关。以生物膜形式存在的微生物可降低抗菌药物的敏感性,甚至产生耐药,这是临床上感染性疾病难以治

疗的原因之一。由于生物膜的组成及结构非常复杂, 并且能够抵抗机体的免疫防御, 致使常规的根管预备、根管冲洗和药物消毒都难将其彻底清除, 并且产生耐药性, 导致根管治疗的失败。氟化物是迄今为止在临床上被应用最多的口腔抑菌药物, 但由于存在着安全风险问题, 限制了其在临床上的广泛应用, 而茶叶是中国的传统国饮, 具有降血压血脂, 增强免疫等功效, 茶叶中所含的茶多酚由于能够抑制多种口腔致病菌的产酸生长而开始应用于对白色念珠菌生物膜的抑制的研究<sup>[8]</sup>。实验比较茶多酚与次氯酸钠对白色念珠菌生物膜的抑菌作用来验证茶多酚对白色念珠菌生物膜的抑菌能力, 为根管充填材料加入茶多酚对白色念珠菌生物膜的抑制作用研究提供实验依据。

## 1 根管充填材料加入茶多酚对白色念珠菌生物膜抑制作用的实验研究

### 1.1 材料

**1.1.1 药材和菌株** 选用云南勐库大叶种普洱茶, 购于云南双江勐库原生大叶茶厂。白色念珠菌 ATCC 10231, 购于广东省微生物菌种保藏中心。

**1.1.2 试剂和仪器** 茶多酚对白色念珠菌生物膜及其相关耐药基因 CDR1、CDR2、MDR1 的抑制作用。

#### 实验所用试剂和仪器:

#### Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
脑心浸液肉汤液体培养基、脑心浸液琼脂培养基	青岛高科技工业园海博生物技术有限公司
乙酸乙酯、三氯甲烷、活性炭、钼酸钠、醋酸、醋酸钠、次氯酸钠、0.2 mol/L 磷酸缓冲液、戊二醛、叔丁醇、生理盐水、四唑盐、总 RNA 提取试剂盒	大连宝生物工程有限公司
聚合酶链式反应试剂引物	大连宝生物工程有限公司
BSA 2245 电子分析天平	海生工生物工程有限公司
SKP-02300 恒温培养箱、无菌操作台	赛多利斯科学仪器(北京)有限公司
SMART SPECTMPLUS 超微量分光光度计、BIO-RAD S1000 ThermalCycler PCR 扩增仪、BIO-RAD Wide Mini-SubCell-TG 电泳仪、BIO-RAD Chemi Doc XRS 凝胶成像仪	苏州市百神科技有限公司
光学显微镜	美国
Sigma-15PK 高速冷冻离心机	上海宙山光学仪器厂
激光共聚焦显微镜 U-TB190 型	德国
	日本 Olympus 公司

**1.1.3 菌液的制备** 复苏菌株接种于脑心浸液肉汤琼脂培养基上, 恒温培养箱培养 24 h 后, 取生长良好的单菌落接种于脑心浸液肉汤液体培养基中, 37 °C 恒温摇床培养 24 h, 血球计数板计数, 调整菌悬液浓度为  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,  $A_{520 \text{ nm}} = 0.38$ , 待用。

### 1.2 方法

**1.2.1 茶多酚的制备** 大叶种普洱茶, 粉碎, 称取 10 g 放入乘有 150 mL 水的烧杯中, 加热 30 min 后过滤, 滤渣再用 50 mL 水继续加热 10 min, 合并 2 次滤液; 用三氯甲烷萃取滤液。分液漏斗中溶液分两层, 上层溶液再用乙酸乙酯进行萃取, 分为两层, 放出下层溶液, 将上层的乙酸乙酯层倒入盛有活性炭的烧杯中, 以便脱色。然后将含有乙酸乙酯的滤液转入烧瓶中进行蒸馏, 剩余的残留物经过干燥即可得到茶多酚<sup>[9]</sup>。将提取物溶于二甲基亚砜, 并稀释为 6 个质量浓度, 药物终质量浓度分别为 92.0, 46.0, 23.0, 11.5, 5.75, 2.88 g/L, 二甲基亚砜终体积分数为 2.5%。

**1.2.2 纯度测定** 茶多酚在酸性条件下与钼酸钠反应生成黄色钼酸酯, 在 341 nm 处有最大吸收, 间接测定茶多酚的含量, 根据反应生成的钼酸酯在最大波长下的吸光度间接得出茶多酚的含量<sup>[10]</sup>。在 10 mL 比色管中分别加入 0.1 g/L 钼酸钠溶液 1 mL, 不同体积的茶汤测试液, 剩余的体积用乙酸-乙酸钠溶液补齐, 然后混合均匀, 用紫外分光光度计测量, 参比溶液选用钼酸钠与乙酸-乙酸钠缓冲溶液。

**1.2.3 实验分组** 实验组为浓度校正后的菌悬液, 加入达到要求的各浓度梯度药物稀释液。菌液对照组为浓度校正后的菌悬液, 加入等体积脑心浸液肉汤液体培养基替代药物稀释液。阴性对照组为达到要求的药物稀释液, 不加入菌悬液。空白组为只含脑心浸液肉汤液体培养基。

**1.2.4 抑菌实验** 取白色念珠菌菌液涂布于脑心浸液琼脂培养基表面, 再分别将浸有茶多酚液、52.5 g/L 次氯酸钠液以及生理盐水(阴性对照组) 的滤纸片(D: 10 mm)贴于脑心浸液肉汤培养基表面, 置于恒温培养箱中 37 °C 过夜, 观察抑菌圈大小。建立白色念珠菌 24 h 生物膜, 参照 Tong 等<sup>[11]</sup>的研究方法, 通过微孔板滴定法检测茶多酚对白色念珠菌生物膜的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度。

### 1.2.5 相关耐药基因CDR1、CDR2和 MDR1表达的检测

总RNA的提取: 选取药物作用24 h, 终浓度为92.0, 46.0, 23.0, 11.5, 5.75 mg/mL的菌悬液及阳性对照组, 血球计数板调整浓度, 取等量细菌进行总RNA的提取, 操作方法遵照总RNA提取试剂说明书, 测定提取总RNA浓度并调节RNA浓度, 使细菌模板量一致。

引物及聚合酶链式反应扩增: 见表1。由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成。

表1 引物及聚合酶链式反应扩增的检测

Table 1 Primers and polymerase chain reaction amplification

基因	引物序列	产物长度(bp)
CDR1	F:5'-CGG TCA ACT TGT AAT GGG-3' R:5'-ACAACA CGG TAG CAG GAG-3'	431
CDR2	F: 5'-AGA TAA AGT GCC AAG AAC-3' R:5'-CAG ATG GAC GAT AAA GAG-3'	479
MDR1	F:5'-TTG TCA TAC TAC AAA TTC CCA CTG C-3' R:5'-ATAACG GTG ATT TCT AAT GGT CTC C-3'	466

注: 遵照 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0 试剂盒说明的反应条件, 将提取的总RNA反转录成cDNA。

琼脂糖凝胶电泳及分析: 取10  $\mu$ L聚合酶链式反应产物与2  $\mu$ L含溴酚兰的载样缓冲液混匀, 加入1%的琼脂糖凝胶小孔中, 90-100 V电压下电泳40 min。电泳完毕, 溴化乙锭染色后, 将琼脂糖凝胶置于UVI凝胶成像仪中, 紫外灯下观察结果, 凝胶成像系统成像保存及分析。

## 1.3 结果

1.3.1 茶多酚的质量检测 茶多酚质量浓度与吸光度值的线性回归为 $y=0.244 8c-7.07\times 10^{-4}$ , 线性范围 $4\times 10^{-6}-36\times 10^{-5}$  g/mL, 重现性=1.3%符合分析要求。经检测茶多酚有效含量达到对照品含量的90%以上, 符合国家有关中药原药材提取物质量标准的相关规定。

1.3.2 茶多酚的抑菌效果 纸片扩散法显示2种根管冲洗液均有明显的抑菌圈, 其中52.5 g/L次氯酸钠液抑菌圈较大, 茶多酚较小, 作为空白对照的生理盐水组没有出现抑菌圈。根据微孔板滴定法测得茶多酚对白色念珠菌生物膜最小抑菌浓度为11.5 g/L, 最小杀菌浓度为23 g/L。四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法测定不同浓度茶多酚对24 h白色念珠菌生物膜的吸光值, 计算其抑制率, 见表2。

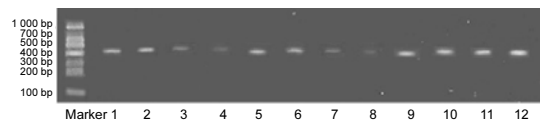
表2 不同质量浓度茶多酚对24 h白色念珠菌生物膜的抑制率

Table 2 Inhibition rate of different concentrations of tea polyphenols on *Candida albicans* biofilm cultured for 24 h

茶多酚质量浓度(g/L)	吸光度( $\bar{x}\pm s$ )	抑制率(%)
92.00	0.341 $\pm$ 0.028	93.87
46.00	0.552 $\pm$ 0.048	81.82
23.00	0.718 $\pm$ 0.086	71.84
11.50	0.958 $\pm$ 0.147	56.72
5.75	1.275 $\pm$ 0.182	39.96
阴性对照组	1.962 $\pm$ 0.151	
空白对照组	0.264 $\pm$ 0.034	

注: 组内两两之间比较,  $P < 0.05$ , 抑制率结果与浓度正相关, 92 g/L茶多酚对白色念珠菌生物膜的抑制率可达93.87%。组内两两之间比较差异均有显著性意义,  $P < 0.05$ 。

1.3.3 茶多酚对耐药基因CDR1、CDR2和 MDR1表达水平的影响 如图1所示, 选取作用24 h后阳性对照组及药物终浓度分别为5.75, 11.5, 23 g/L的菌药混悬液测定耐药基因CDR1、CDR2和MDR1的表达水平。①阳性对照组及药物终浓度为5.75 g/L时聚合酶链式反应扩增的耐药基因CDR1、CDR2和MDR1电泳条带较清晰; 药物终浓度11.5 g/L时CDR1、CDR2的聚合酶链式反应扩增基因的电泳条带亮度变淡, 耐药基因MDR1电泳条带仍较清晰; 药物终浓度为23.0 g/L时, 耐药基因CDR1、CDR2特异性条带亮度更加暗淡, 耐药基因MDR1电泳条带依然较清晰。②4组平行组同等条件下多次重复实验操作, 凝胶成像系统软件对图像进行电泳条带吸光度值测定。



1-4 为 CDR1 基因标本; 5-8 为 CDR2 基因标本; 9-12 为 MDR1 基因标本; 1, 5, 9 为菌液对照组; 2-4, 6-8, 10-12 为茶多酚 5.75, 11.5, 23 g/L 的菌药混悬液组。

注: 由 2-4, 6-8 可知: 随着药液浓度增加, 电泳条带逐渐暗淡, 说明茶多酚影响 CDR1 和 CDR2 的基因表达; 而 10-12 表明药液浓度虽然增加, 但电泳条带近似相同, 说明茶多酚对 MDR1 的影响较小或者无影响。

图1 茶多酚对耐药基因 CDR1、CDR2 和 MDR1 表达水平的影响

Figure 1 Effect of tea polyphenols on the expression levels of resistance genes CDR1, CDR2 and MDR1

方差分析耐药基因CDR1和CDR2,  $P < 0.05$ , 差异有显著性意义, 耐药基因MDR1,  $P > 0.05$ , 无显著性意义。说明各浓度药物对白色念珠菌耐药基因CDR1和

CDR2表达产生不同程度的抑制或干扰, 见表3。

表3 不同质量浓度茶多酚作用后耐药基因 CDR1、CDR2、MDR1 的转录表达的水平

Figure 3 Transcriptional expression levels of resistance genes CDR1, CDR2 and MDR1 after induced with different concentrations of tea polyphenols ( $\bar{x}\pm s$ , g/L)

基因	药物浓度(g/L)		
	23.00	11.50	5.75
-	274.36±5.39	216.76±5.08	246.79±5.12
CDR1	235.81±6.36	204.39±6.98	246.86±5.09
CDR2	192.09±6.14	125.58±3.49	245.98±5.10
MDR1	117.98±7.89	101.35± 6.28	245.73±4.98

注: 耐药基因 CDR1 和 CDR2,  $P < 0.05$ , 差异有显著性意义, 耐药基因 MDR1,  $P > 0.05$ , 无显著性意义。

## 2 白色念珠菌生物膜对根管充填治疗的抑制与影响

**2.1 资料来源** 文章采用检索CNKI数据库和pubmed数据库的方法获取研究文献<sup>[12-13]</sup>, 检索时间范围1990至2012年, 检索词为“白色念珠菌(*candida albicans*); 生物膜 (biological membrane); 耐药性 (drug resistance); 茶多酚(tea polyphenols); 根管充填材料 (root canal filling material); 根管糊剂 (root canal paste); 抑菌药物 (antibacterial drugs); 抑菌作用 (bacteriostatic action)”, 检索出相关文献43篇, 纳入研究的文献共28篇<sup>[14-41]</sup>。

**2.2 入选标准** ①研究的主题包括白色念珠菌生物膜对根管充填治疗的抑制与影响、白色念珠菌生物膜的形成及其耐药机制。检索的文献中排除与研究主题无关的文献12篇。②研究所撰写的文章类型包括原著、实验分析及病例分析等。检索文献中排除综述类文章3篇。③文献内容筛选如下, 检索的文献中白色念珠菌生物膜形成过程与形态学特点的研究文献共10篇, 均为英文文献, 其中涉及2篇文献为同一实验项目, 且为同一组实验人员进行的研究, 定为重复研究文献, 选取其中1篇进行深入分析。在影响白色念珠菌生物膜形成的相关因素研究中检索文献3篇, 同样检索出重复的2篇研究文献, 选取其中1篇进行深入分析。白色念珠菌生物膜耐药机制研究文献19篇, 3篇文献为重复文献, 选取其中1篇进行深入分析。④文章的筛选和提取由第一作者进行, 与其他作者讨论后通过阅读标题和摘要进行初步筛

选, 最终保留英文文献22篇, 中文文献6篇进行分析总结。

**2.3 质量评估** 符合纳入标准的28篇研究文献中, 文献[14-21]探讨了白色念珠菌生物膜形成过程与形态学特点; 文献[22-23]分析了干影响白色念珠菌生物膜形成的相关因素; 文献[24-41]探讨了白色念珠菌生物膜耐药机制。

**2.4 白色念珠菌生物膜的形成及其耐药机制** 了解生物膜形成过程的特点及其机制对研究根管充填材料加入茶多酚对白色念珠菌生物膜的抑制作用具有重要意义<sup>[14]</sup>。以下总结了白色念珠菌生物膜的形成及其分子生物学机制和耐药机制的最新进展, 为根管充填材料加入茶多酚对白色念珠菌生物膜的抑制作用的研究及临床应用提供参考。

**2.4.1 白色念珠菌生物膜形成过程与形态学特点** 生物膜对抗抗生素和机体免疫吞噬作用的特征是生物材料相关感染性疾病的重要原因<sup>[15]</sup>。感染部位一旦形成生物膜或植人体内的生物材料表面一旦形成了生物膜, 由于其难以被特异性抗体、大多抗真菌药物等物质所彻底杀灭, 白念菌生物膜引起的感染性疾病因而大都是慢性和难治性的。白念菌生物膜逐渐成为许多学者关注的热点, 为了深入了解白色念珠菌生物膜的相关特征, 首先应该对其形成的生物膜进行形态学观察<sup>[16]</sup>。

Chandra等<sup>[17]</sup>使用荧光显微镜观察白色念珠菌生物膜的形成过程, 发现生物膜的形成通过三个不同的发展阶段, 分为早期(0-11 h)、中期(12-30 h)和成熟期(31-72 h)。用倒置显微镜可以观察到培养2 h在培养孔的底面形成由酵母细胞组成的微菌落; 2-4 h可见酵母细胞出芽并开始形成菌丝; 8 h微菌落互相融合, 形成酵母细胞及菌丝密集排列的网状结构; 24-48 h酵母细胞沿着菌丝团块样聚集, 形成多层的膜状结构。成熟的白念珠菌生物被膜是一个在细胞外基质包裹下的由孢子、菌丝体或假菌丝组成的致密网状系统, 呈一个具有不均质性和水道分支的有机三维立体小菌落结构。

目前对生物膜进行形态学研究的方法主要是使用荧光显微镜、扫描电镜、激光共聚焦显微镜观察。扫描电镜的优点是能直接观测生物膜中细胞情况, 但是需要对标本进行脱水、固定、包埋、染色等处理, 导致观察

结果与实际有差异。而激光共聚焦显微镜可做到原位、实时、动态观察生物膜结构, 不会破坏生物膜的结构, 可得生物膜的三维信息<sup>[18]</sup>。Kuhn等<sup>[19]</sup>利用激光共聚焦显微镜与荧光染色方法可观察到在附着于生物材料的基底层是一两个细胞厚度的具有代谢活性的芽孢层, 位于其上的是厚度为450–550  $\mu\text{m}$ 相互交织的大量具有代谢活性的菌丝体以及生物膜外表面的多糖基质层, 各层间有大小不等的间隙及孔道相贯通。正是这种三维空间网状结构为细胞营造了一个便于物质交换及细胞间信号交流的生存环境<sup>[20-21]</sup>。

#### 2.4.2 影响白色念珠菌生物膜形成的相关因素

**接触物质表面的性质<sup>[22]</sup>:** 一方面是接触物表面的物理性质如粗糙与否会影响真菌附着难易及生物被膜的均一性, 另一方面是接触物的化学性质也会影响生物被膜的形成。

**其他:** 对于白色念珠菌生物被膜的形成还存在许多其他的影响因素, 如白色念珠菌的形态种型、温度、营养等环境因素、白色念珠菌生物被膜的密度感应系统等<sup>[23]</sup>。

**2.4.3 白色念珠菌生物膜耐药机制** 国内外一些研究<sup>[24-25]</sup>, 指出生物膜状态下的细菌相对其浮游状态具有显著增强的耐药性。生物膜是一种黏附于非生物或生物表面的微生物菌落, 它们包裹于它们自身产生的细胞外基质中, 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细胞相对应的存在形式, 其最主要的特点是对临床常规抗真菌药物明显耐药, 而且对宿主免疫防御机制有很强的抗性<sup>[26]</sup>。

**生物膜基质阻碍药物的渗透:** 生物膜基质对抗生素的不敏感是由于生物膜内细菌分泌的胞外多聚物被膜形成了屏障, 阻止了抗生素的穿入。形成生物膜的菌株, 细菌密度较高, 细菌间空隙狭小并且含有大量的不溶性蛋白多糖, 使抗生素的渗入变得异常困难<sup>[27]</sup>。Thurnheer等<sup>[28]</sup>利用荧光探针发现这种细胞外基质在生物被膜外形成的是高度迂曲孔道样的结构, 可能是阻止或延迟某些分子直径较大的物质渗入的原因。有实验证实, 从生物被膜中衍生出的游离菌体同样会具有耐药性, 其程度却低于其在生物被膜内的耐药性。因此, 生物被膜中的细胞外基质有阻碍或延缓药物渗入生物被膜的作用, 但是这也并不是白色念珠菌耐药的关键, 其

中还必有其他机制参与作用。

**生物膜细胞生长速度和营养受限:** 由于药物效力通常和细胞生长力密切相关, 生长旺盛的细胞对药物的吸收更多更快, 而生物膜内的细胞由于受营养供给的限制, 生长缓慢从而对抗生素不敏感<sup>[29]</sup>。Baillie等<sup>[30]</sup>用灌注生物膜发酵桶去评价白色念珠菌生物膜对两性霉素B的敏感性是否依赖生长速度, 结果显示完整的生物膜在测试所有速率中对两性霉素B都耐药, 而浮游细胞则只在低速率时耐药。从生物膜中分离出来的细胞比完整生物膜细胞耐药性低, 但比浮游细胞的耐药性强。这些研究表明, 白色念珠菌生物对两性霉素B的耐药性不仅仅由于低生长率, 还依赖生物膜的一些其它特点<sup>[31-32]</sup>。

**生物膜耐药基因的表达:** 当生物体接触在某一表面形成生物膜时, 在一定程度上与细菌表达了一种特殊的具有保护性的生物表型, 是由独特基因所控制的。目前有的研究者开始检测白色念珠菌形成生物膜时被激活或抑制的基因, 这些基因很有可能与生物膜耐药有关<sup>[33]</sup>。Mukherjee等<sup>[34]</sup>利用基因敲除对比了生物被膜在3个时期中这3个基因的mRNA的表达水平及表达产物的功能活性, 结果证实在中期和成熟期它们均有表达和产生外排药物的活性, 且均强于早期。这与耐药性的变化不一致, 提示这3个基因很可能只在早期的生物被膜的耐药中起作用, 而成熟生物被膜的耐药机制目前仍不是很清楚。同时, 用RNA印迹技术分析游离白色念珠菌细胞和生物被膜细胞显示在生物被膜上有不同于游离菌株的基因表达。这些提示其耐药性可能与某些基因表达有关<sup>[35]</sup>。

**生物膜内细胞膜的基质成分影响:** Kohli等<sup>[36]</sup>发现, 游离状态的白色念珠菌随着耐药性增加, 细胞膜的麦角甾醇含量有所降低, 质膜的流动性也随之递减。Khot等<sup>[37]</sup>发现, 生物膜底部芽生孢子层的细胞的耐药性要比上层的菌丝相和酵母相的细胞高出10倍以上, 在对生物膜孢子层细胞的麦角甾醇合成相关酶的基因进行反转录-聚合酶链反应的定量分析时也发现, 它们与高耐药性存在相关。目前尚不清楚这种变化是否影响到细胞膜对药物通透性及与药物的结合能力<sup>[38]</sup>。

总之, 白色念珠菌生物膜的耐药性是一个复杂的过程, 不能单独用一种分子机制来解释, 可能是两种或更多种机制共同作用的结果。

### 3 讨论

茶多酚对近百种细菌均有抑制作用,其抑菌能力与浓度呈正相关。茶多酚对革兰阴性需氧杆菌和球菌、兼性厌氧细菌、球菌及球杆菌、革兰阳性球菌、产芽胞杆菌都有明显的抑制作用<sup>[39]</sup>。实验采用微量肉汤稀释法进行抑菌实验,致力于定量测定茶多酚抑制白色念珠菌生物膜生长的能力。该实验在肉眼观察的基础上,对培养物进行吸光度测定及统计学分析,保证了结果的可靠性。得出茶多酚在其药物质量浓度达11.5 g/L时即对白色念珠菌表现出极为明显的抑菌作用,而终质量浓度达23.0 g/L时即可完全杀死白色念珠菌。白色念珠菌是重要的人体致病真菌,在机体免疫功能、一般防御力下降或正常菌群相互制约作用失调,就会大量繁殖并改变生长形式侵入细胞引起疾病。

白色念珠菌生物膜耐药机制由多药耐药蛋白介导,多药耐药蛋白包括ATP结合转运蛋白及易化扩散载体超家族两种类型。ATP结合转运蛋白家族中的念珠菌耐药基因CDR1、CDR2及MDR1已被证实与白色念珠菌耐药性密切相关<sup>[40]</sup>。CDR1、CDR2和MDR1的过度表达是游离态白色念珠菌对抗真菌类药物耐药的重要原因之一,CDR1及CDR2增加药物的外排,MDR1抑制药物摄入,从而降低细胞内药物浓度<sup>[41]</sup>。

随着茶多酚药物浓度的梯度增加,致病因子 CDR1 和 CDR2的PCR 产物电泳图谱亮度逐渐变暗,表明其表达量呈明显下降趋势。可以推断,茶多酚对白色念珠菌生长的影响是由于其抑制或干扰了致病因子CDR1和CDR2基因片段转录过程中的表达,从而导致菌丝无法形成以及细胞壁的破裂。另外,临床使用的根管充填材料,是白色念珠菌生物膜形成的良好介质。由于基于茶叶易于获得,茶多酚制作成本低廉,毒副作用小,不易产生耐药性,因此,根管充填材料通过加入茶多酚,使用抗菌材料会有效降低生物膜感染发生的概率,为开发研制一种理想的根管充填材料加入新型高效消毒药物提供了新的思路。

**作者贡献:** 许颖、吕庆进行实验设计,吕庆进行实验实施及评估,资料收集为张慧明、吕庆、吕庆、康梁成文,许颖、吕庆对实验进行审校并对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经

济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验获得所在单位的伦理委员会批注,符合伦理学标准。

**作者声明:** 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

### 4 参考文献

- [1] Mah TF,O'Toole GA.Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.Trends Microbiol.2001;9(1):34-39.
- [2] Chandra J,Kuhn DM,Mukherjee PK,et al.Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance.J Bacteriol.2001;183(18): 5385-5394.
- [3] Sun Z,Liu H. Yi Xue Yan Jiu Za Zhi. 2012;41(6):182-184. 孙智,刘泓.新型根管充填材料的回顾研究[J].医学研究杂志,2012,41(6):182-184.
- [4] Liu M,Li Z,Gao WX. Zhong Guo Lao Nian Xue Za Zhi. 2009;29(9):1144-1145. 刘明,李泽,高文信.两种根管充填材料的封闭性能比较[J].中国老年学杂志,2009,29(9):1144-1145.
- [5] Wang P,Liang HY,Wu J,et al. Zhong Guo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu. 2010;14(12):2179-2182. 王萍,梁焕友,吴坚,等.两种根管充填材料的封闭性能比较[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(12):2179-2182.
- [6] Qin H,Gong YQ,Xu ZH. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu.2011;15(2): 232-235. 秦晗,龚永庆,徐宏志.根管充填体外模型构建中X射线牙片的作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(2): 232-235.
- [7] Gu LS,Ling JQ. Guoji Kouqiang Yixue Zazhi.2006;33(5): 349-351. 古丽莎,凌均荣.根管生物膜及其临床控制的研究进展[J].国际口腔医学杂志,2006,33(5):349-351.
- [8] Qi FF,Wang S,Guo J.Xiandai Kouqiang Yixue Zazhi.2011; 25 (5): 359-362. 齐芳芳,王山,郭洁.茶多酚、厚朴酚抑制早期人工根面龋作用的实验研究[J].现代口腔医学杂志,2011,25(5):359-362.
- [9] Luo YN,Yu XY,Liu LQ.Hua Xue Shi Jie.2011;52(9):526-533. 罗亚楠,于晓洋,刘立群.茶叶中茶多酚的提取及分析检测[J].化学世界,2011,52(9):526-533.
- [10] Liao XL,Lang HY,Xu WF,et al.Fenxi Shiyanshi.2003;22(5): 70-72. 廖晓玲,郎惠云,徐文峰,等.钼酸铵分光光度法测定绿茶中的茶多酚[J].分析实验室,2003,22(5):70-72.
- [11] Tong Z,Dong L,Zhou L,et al.Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro.Peptides.2010;31 (11): 2003-2008.
- [12] 中国知网.中国学术期刊总库[DB/OL].2012-08-10. <https://www.cnki.net>
- [13] SCI数据库.Web of Sciencevia ISI Web of Knowledge[DB/OL]. 2012-08-10.<http://ip-science.thomsonreuters.com/mjl>
- [14] Soustre J,Rodier MH,Imbert-Bouyer S,et al.Caspofungin modulates in vitro adherence of Candida albicans to plastic coated with extracellular matrix proteins.J Antimicrob Chemother. 2004;53(3):522-525.

- [15] Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, et al. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3591-3596.
- [16] Alem MA, Douglas LJ. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1): 41-47.
- [17] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001;183(18): 5385-5394.
- [18] Hazan Z, Zumeris J, Jacob H, et al. Effective prevention of microbial biofilm formation on medical devices by low-energy surface acoustic waves. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(12):4144-4152.
- [19] Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, et al. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun.* 2002; 70(2):878-888.
- [20] Chandra J, Patel JD, Li J, et al. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(12):8795-8801.
- [21] Andes D, Nett J, Oschel P, et al. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun.* 2004;72(10): 6023-86031.
- [22] Tsang CS, Ng H, McMillan AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin Oral Investig.* 2007;11(4):361-368.
- [23] LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3839-3846.
- [24] Szomolay B, Klapper I, Dockery J, et al. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms. *Environ Microbiol.* 2005;7(8): 1186-1191.
- [25] Chang GJ, Wang AL, Shan Dong Yi Yao. 2007;47(5):81-82. 常桂娇, 王艾琳. 细菌生物膜及其与细菌耐药性关系的研究进展 [J]. *山东医药*, 2007, 47(5):81-82.
- [26] Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, et al. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell.* 2006;5(10):1770-1779.
- [27] Zhang L, Huang YC, Xi TF. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Yu Lin Chuang. 2006;10(3):194-196. 张良, 黄云超, 奚廷斐. 表皮葡萄球菌生物膜形成与生物材料感染 [J]. *生物医学工程与临床*, 2006, 10(3):194-196.
- [28] Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, et al. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(3):1702-1709.
- [29] Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2006;53(7):326-332.
- [30] Baillie GS, Douglas LJ. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(8):2146-2149.
- [31] Shi Q, Wang HN, Liu L. Wei Sheng Wu Xue Tong Bao. 2008; 35(10):1633-1637. 史巧, 王红宁, 刘立. 细菌生物膜与耐药性相关性研究进展 [J]. *微生物学通报*. 2008;35(10):1633-1637.
- [32] Borriello G, Werner E, Roe F, et al. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7): 2659-2664.
- [33] Wang YX, Li HL, Li PY. *Zhonghua Weishengwuxue He Mianyi Xue Zazhi.* 2003;23(6):428-431. 王勇翔, 李华林, 李平洋. 表皮葡萄球菌生物膜形成与ica操纵子的相关性研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(6): 428-431.
- [34] Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun.* 2003;71(8):4333-4340.
- [35] Chen H, Fujita M, Feng Q, et al. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(14):5048-5052.
- [36] Kohli A, Smriti, Mukhopadhyay K, et al. In vitro low-level resistance to azoles in *Candida albicans* is associated with changes in membrane lipid fluidity and asymmetry. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(4):1046-1052.
- [37] Khot PD, Suci PA, Miller RL, et al. small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and beta-1,6-glucan pathway genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3708-3716.
- [38] Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):3805-3813.
- [39] Xue P, Liu DC. *Zhong Guo Yi Yao Dao Bao.* 2008;5(23):21-22. 徐芑, 刘东成. 绿茶多酚抗氧化和抑菌机制的研究 [J]. *中国医药导报*, 2008, 5(23):21-22.
- [40] Cao YB, Xu Z, Zhang JD, et al. *Zhongguo Xinyao Zazhi.* 2004; 13(2):102-105. 曹永兵, 徐铮, 张军东, 等. 白色念珠菌耐药性产生的分子机制 [J]. *中国新药杂志*, 2004, 13(2):102-105.
- [41] Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1587(2-3):240-248.