

和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜的抑制作用研究

【摘要】目的：具核梭杆菌作为牙周病的常见病原菌之一，引起了口腔感染性疾病的发生和传播。为了治疗该类疾病，抗生素的滥用使得病菌产生耐药性的问题频发，对人类健康造成危害。因此本课题探究了和厚朴酚对改善和解决具核梭杆菌通过生物被膜发挥作用产生耐药性问题的作用。

方法：以具核梭杆菌作为受试菌株，以和厚朴酚作为受试药，以氯己定作为阳性药对照。首先采用微孔板法构建具核梭杆菌生物被膜体外模型，并通过 CCK-8 法、结晶紫半定量黏附实验测定生物被膜生长动力曲线和基质总量生长曲线；场发射扫描电子显微镜（SEM）观察生物被膜的微观形态结构，这三种方法验证生物被膜模型构建成功与否。其次，采用微量稀释法测定和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜的最低抑膜浓度（MBIC）；采用 CCK-8 和结晶紫半定量黏附实验测定和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜代谢活性及基质总量的影响；通过 SEM 观察药物干预后受试菌株生物被膜的微观结构及形态变化。

结果：根据三种验证方法得知具核梭杆菌受试菌株的生物被膜初始黏附期为 0-36 h，聚集期为 36-48 h，成熟期为 48-96 h。和厚朴酚对具核梭杆菌的最佳药物干预浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ ，中药单体和厚朴酚可在一定程度上降低具核梭杆菌不同阶段形成的生物被膜的代谢活性（ $P<0.05$ ）以及减少生物被膜基质总量（ $P<0.05$ ），破坏生物被膜形态结构，导致菌体死亡。

结论：和厚朴酚对具核梭杆菌黏附期、聚集期和成熟期生物被膜的形成有一定的抑制作用，进而有望抵抗耐药性的产生。因此，为开发中药单体和厚朴酚成为一种新型的生物被膜抑制剂奠定了理论基础。

【关键词】和厚朴酚；具核梭杆菌；生物被膜

Study on Inhibitory effect of honokiol on the biofilm of

Fusobacterium nucleatum

[Abstract] Objective: As one of the common pathogens of periodontal disease, *Fusobacterium nucleatum* causes the occurrence and spread of oral infectious diseases. In order to treat this type of disease, the abuse of antibiotics causes frequent problems of bacterial resistance, posing a threat to human health. Therefore, the purpose of this study is to explore new drugs to improve and solve the problem of drug resistance caused by *Fusobacterium nucleatum* acting through biofilms.

Method: Using *Fusobacterium nucleatum* as the test strain, honokiol as the test drug, and chlorhexidine as the positive drug control. Firstly, an in vitro model of *Fusobacterium nucleatum* biofilm was constructed using the microplate method; And the growth kinetics curve of biofilm and total matrix growth curve were measured through CCK-8 method and crystal violet semi quantitative adhesion experiment; Three methods of observing the microstructure of biofilm using field emission scanning electron microscopy (SEM) are used to verify the success of biofilm model construction.

Secondly, the minimum inhibitory concentration (MBIC) of magnolol on the biofilm of *Fusobacterium nucleatum* was determined using micro dilution method; The effects of magnolol on the metabolic activity and total substrate of *Fusobacterium nucleatum* biofilm were measured using CCK-8 and crystal violet semi quantitative adhesion experiments; Observe the microstructure and morphological changes of the biofilm of the tested strain after drug intervention through SEM.

Result: According to the three validation methods, the initial adhesion period of the biofilm of the tested strains of *Fusobacterium nucleatum* was 0-36 hours, the aggregation period was 36-48 hours, and the maturity period was 48-96 hours. The optimal drug intervention concentration for *Fusobacterium nucleatum* with magnolol is 60 µg/mL, traditional Chinese medicine monomer and magnolol can to some extent

reduce the metabolic activity of biofilms formed by *Fusobacterium nucleatum* at different stages ($P<0.05$) and reduce the total amount of biofilm matrix ($P<0.05$), destroy the morphology and structure of biofilms, and lead to bacterial death.

Conclusion: Honokiol has a certain inhibitory effect on the formation of biofilms during the adhesion, aggregation, and maturation stages of *Fusobacterium nucleatum*, which is expected to resist the development of drug resistance. Thus, the research provides a theory foundation for developing traditional Chinese medicine monomer and magnolol as a novel biofilms inhibitor.

[Keywords] honokiol *Fusobacterium nucleatum* biofilm

目 录

1 前言	1
1.1 研究背景	1
1.2 中药单体和厚朴酚的研究进展	2
1.3 研究意义	3
2 具核梭杆菌生物被膜体外模型的构建	4
2.1 实验材料	4
2.1.1 实验菌种	4
2.1.2 实验仪器	4
2.1.3 试剂与药物	4
2.2 实验方法	5
2.2.1 培养基的配制	5
2.2.2 实验菌悬液的制备	5
2.2.3 微孔板法构建具核梭杆菌生物被膜体外模型	6
2.2.4 CCK-8 法测定生物被膜的生长动力曲线	6
2.2.5 结晶紫半定量粘附实验测定生物被膜总量生长曲线	6
2.2.6 场发射扫描电子显微镜（SEM）观察生物被膜微观形态结构	6
2.3 实验结果及讨论	7
2.3.1 具核梭杆菌受试菌株生物被膜生长动力曲线	7
2.3.2 具核梭杆菌受试菌株生物被膜总量生长曲线	8
2.3.3 场发射扫描电子显微镜（SEM）观察具核梭杆菌生物被膜的形态结构	9
2.4 小结	9
3 和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜的作用	11
3.1 实验材料	11
3.1.1 实验菌种	11
3.1.2 实验仪器	11
3.1.3 试剂与药物	11

3.2 实验方法	12
3.2.1 培养基的配制	12
3.2.2 实验菌悬液的制备	12
3.2.3 药物贮备液的配备	12
3.2.4 测定和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜的最低抑膜浓度（MBIC）	12
3.2.5 CCK-8 法测定和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜的细菌代谢活性影响	13
3.2.6 结晶紫半定量粘附法测定和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜总量的影响	13
3.2.7 SEM 观察和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜微观形态的影响	14
3.2.8 统计学分析	14
3.3 实验结果与讨论	14
3.3.1 和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜的最低抑膜浓度（MBIC）	14
3.3.2 和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜细菌代谢活性影响	15
3.3.3 和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜基质总量影响	16
3.3.4 和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜微观形态的影响电镜图	18
3.4 小结	18
4 结论与展望	20
4.1 结论	20
4.2 展望	20
参考文献	21
致谢	23

1 前言

1.1 研究背景

具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, Fn) 是梭杆菌门、梭杆菌属的模式物种, 表观呈现为梭形的杆菌, 属于革兰氏阴性菌、厌氧菌。具核梭杆菌与口腔流行性疾病慢性牙周炎有强相关性, 在牙周炎患者的口腔中有高检出率, 是牙周袋、龈下菌斑以及根管等口腔感染疾病的主要优势菌^[1]。此外具核梭杆菌还与一系列全身疾病密切相关, 如促进口腔鳞状细胞癌、结直肠癌^[2]、胃癌^[3]等感染性疾病。由此可见, 具核梭杆菌在临床上对全社会人类造成的危害不容小觑。

具核梭杆菌的致病机制一方面作为共生菌, 将口腔早期定植细菌和晚期定植细菌连接起来, 促进牙菌斑生物膜的发育成熟; 另一方面作为机会性致病菌和致癌菌, 参与多种口腔疾病的发生发展^[4]。

细菌耐药性 (Resistance to Drug) 也被称抗药性, 是指细菌对于抗菌药物作用的耐受性, 当这种情况发生时, 药物的治疗效果就明显降低。由于抗生素的不合理使用, 耐药菌株增加, 抗生素效率降低, 加剧了全球抗生素耐药的发生和传播, 严重地威胁着人类的健康。

在各种耐药机制中, 细菌生物被膜的形成被认为是主要的机制。大部分细菌通过在一定条件下形成生物被膜从而形成一种自我保护机制, 造成细菌耐药。细菌的生物被膜形成后, 对抗菌药物的耐药性通常是浮游菌的 10 倍-1000 倍, 是抗菌药物治疗细菌感染失败的主要原因^[5]。生物被膜是细菌生长繁殖过程中分泌的胞外多糖、脂质和蛋白质等物质, 使抗菌药物不能穿透胞外基质, 导致细菌对抗菌药物的敏感性降低, 是细菌耐药的重要机制^[6]。

在常见牙周病中, 牙菌斑生物被膜是牙周病的始动因子, 一旦口腔菌群与宿主免疫之间相互制约的平衡被打破, 就有发生牙周感染的可能, 从而引发炎症反应, 导致软硬组织的破坏^[7]。抑制生物被膜形成, 对逆转细菌耐药性有极大的增强作用^[8], 对细菌耐药性的控制和优化有增强作用。因此针对以具核梭杆菌作为牙周疾病主要致病菌的口腔感染性疾病的治疗, 也应针对细菌生物被膜的形成抑制为主。

氯己定 (Chlorhexidine, CHX) 是目前口腔治疗的常见药物, 为根管消毒药物对慢性根尖周炎均有较好的疗效^[9]。但其覆盖范围一般, 无法杀灭芽苞、结核菌和病毒, 并且容易受溶液或体液中的阴离子影响而降低疗效, 同时对口腔黏膜有轻度的刺激作用。因此需要探索出更加温和、适度的药物。

1.2 中药单体和厚朴酚的研究进展

中药与现代抗菌药物相比, 除了有良好的抑菌作用之外, 还可抑制生物被膜, 具有不易产生耐药性的特点^[10]。

和厚朴酚(honokiol)是木兰科木兰属中药厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd.et Wils)的主要化学成分。和厚朴酚属于联苯酚类化合物, 传统中医认为厚朴具有消除胸腹满闷, 止痛, 健胃, 下气降逆, 止咳, 祛除水毒, 活血化瘀等作用^[11]。据文献报道, 中药厚朴单体成分和厚朴酚类抗菌肽模拟物具有广谱抗菌活性, 快速杀菌和不易产生耐药性的特点^[12]。研究表明, 和厚朴酚对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌均可产生抑制作用^[13]。

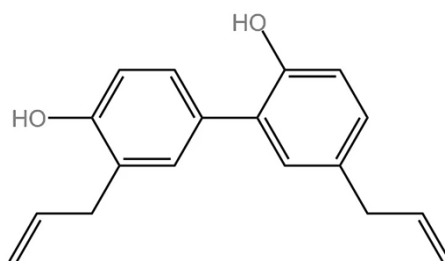


图 1-1 和厚朴酚化学结构式

据刘丹^[14]、白靖文^[15]等人的研究表明, 和厚朴酚对幽门螺杆菌、猪链球菌的浮游菌具有优良的抗菌作用, 和厚朴酚是厚朴对抗杆菌作用的主要活性成分, 可通过抑制杆菌群体感应的 LuxS/AI-2 系统中的 *luxS* 基因的高表达, 使 AI-2 分泌减少, 从而降低下游与鞭毛形成有关的 *mqsR*、*mcbR*、*csrA*、*flhDC* 和 *fliC* 基因表达^[16]。

因此在和厚朴酚对杆菌抑制作用的研究中，大多仅探究了对浮游菌的抑菌作用，而和厚朴酚对具核梭杆菌的生物被膜形成的作用尚未有学者探讨。因此本课题选用中药单体和厚朴酚对具核梭杆菌的生物被膜形成的抑制作用进行探究。

1.3 研究意义

具核梭杆菌作为在牙髓、牙周和其他炎症性病灶中的优势菌种引起的一系列口腔感染疾病对全社会人类健康造成严重危害。因此，探究对具核梭杆菌的抑制方法对社会公共健康发展具有重要意义。

口腔科临床中常用的抗菌剂氯己定（CHX）在目前的治疗中仍存在着无法杀灭芽苞、结核菌和病毒，易受溶液或体液中的阴离子影响而降低疗效以及对口腔黏膜有刺激作用；长期使用容易引起细菌耐药等问题。与此同时，细菌耐药问题的迸发，表明了针对导致细菌耐药的主要作用机制——生物被膜的治疗尤为重要。因此探究更加温和且有效、使得对人体产生不良作用更低的的用药方式成为当务之急。

由于和厚朴酚在现代药理学中具有显著的抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌的作用，同时利用了中药具有良好抑菌作用且不易引起细菌耐药性的优势，以和厚朴酚作为受试药，具核梭杆菌作为受试菌，氯己定作为阳性对照，探究中药单体和厚朴酚对具核梭杆菌生物被膜形成的抑制作用，为后续开发出可有效逆转细菌耐药性的中药生物被膜抑制剂以及为抗菌药物的选择方向提供更多可能。

2 具核梭杆菌生物被膜体外模型的构建

2.1 实验材料

2.1.1 实验菌种

具核梭杆菌标准株（ATCC 25586），购于北京保藏生物科技中心。

2.1.2 实验仪器

表 2-1 实验仪器

名称	生产厂家
SW-CJ-1F 超净工作台	苏净集团安泰公司
24 孔板	无锡耐思生物科技有限公司
DHP-9032B 电热恒温培养箱	上海一恒科学仪器有限公司
氧气指示剂	日本三菱瓦斯化学株式会社
JSM-7610F Plus 场发射扫描电子显微镜	日本电子株式会社
14mm 无菌爬片	北京白鲨生物科技有限公司
iMark 酶标仪	美国 BIO-RAD 公司
厌氧密封培养袋	日本三菱瓦斯化学株式会社
DSX-24L 自控型手提式高压蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂
厌氧产气袋	日本三菱瓦斯化学株式会社
一次性无菌平皿	广东环凯生物科技有限公司
平底 96 孔板	无锡耐思生物科技有限公司

2.1.3 试剂与药物

表 2-2 试剂与药物

名称	批号	生产厂家
0.1%结晶紫	C916088	上海麦克林生化科技有限公司
脑心浸液肉汤	20220208	青岛高科技工业园海博生物技术有限公司
CCK-8 试剂盒	MA0218-2-Oct-28G	大连美仑生物技术有限公司

2.5%戊二醛固定液（电镜专用）	20220708	北京索莱宝科技有限公司
PBS 缓冲溶液（7.2~7.5）	GP2211005830	武汉塞维尔生物科技有限公司：
无水乙醇	20211221	广东光华科技股份有限公司
叔丁醇	20200612	天津市大贸化学试剂厂
甲醇	20220601307	天津市致远化学试剂有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 培养基的配制

脑心浸液琼脂培养基（BHI）：按照使用说明配备，准确称取培养基颗粒 5.2 g 置于烧杯中，加入去离子水 100 mL；

脑心浸液液体培养基（BHI）：按照使用说明配备，准确称取培养基颗粒 7.7 g 置于烧杯中，加入去离子 200 mL；

将以上培养基充分搅匀并溶解后，pH 值调节至 7.4 ± 0.2 ，封口后于 121 °C 高压灭菌 30 min。恒温至 50°C 左右时加入氯化血红素（5.0 µg/mL）和维生素 K1（10.0 µg/mL）（琼脂培养基需加入 5% 无菌脱纤维羊血后倾注于平板中），混匀后于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2.2 实验菌悬液的制备

用接种环取活化后的受试菌少许，加入无菌生理盐水中稀释调整至与 0.5 号麦氏比浊管的浊度一致，即达到 1.0×10^8 CFU/mL 浓度。取上述菌悬液 200 µL，加入 BHI 液体培养基稀释，得到浓度为 1.0×10^6 CFU/mL 的实验菌悬液，现用现配。

2.2.3 微孔板法构建具核梭杆菌生物被膜体外模型

取 2.2.2 制备的具核梭杆菌菌悬液每孔 200 μL 接种到 96 孔板中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置下分别厌氧培养至 0、12、24、36、48、72、96、120 h。

2.2.4 CCK-8 法测定生物被膜的生长动力曲线

采用 CCK-8 实验测定受试菌株的生物被膜生长动力曲线。将 2.2.3 制备的生物被膜相应的时间段取出，使用无菌移液枪吸取并去掉各孔培养基和浮游菌、取生理盐水冲洗 3 遍，自然晾干后，加入 100 μL 肉汤，避光加入 10 μL 的 CCK-8 溶液/孔，全部加完后振荡混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h，用酶标仪测量 OD_{450} 处的吸光度值，记录结果并绘制菌株的生物被膜生长动力曲线。

2.2.5 结晶紫半定量粘附实验测定生物被膜总量生长曲线

采用结晶紫半定量黏附实验测定受试菌株的生物被膜基质总量生长曲线。取 2.2.3 中构建的生物被膜，在相应时间段，使用无菌移液枪吸取并去掉各孔培养基和浮游菌，取生理盐水轻洗 1-3 遍后，每孔加 200 μL 甲醇固定生物被膜 30 min，吸弃甲醇，加入 100 μL 0.1% 结晶紫染液，染色 15 min 后吸弃并使用生理盐水轻洗未粘附染料 1-2 遍。最后，加入 95% 乙醇溶解与生物被膜结合的染料，充分溶解后用酶标仪测量 OD_{570} 的吸光度值，记录结果，绘制菌株生物被膜基质的生长曲线。

2.2.6 场发射扫描电子显微镜（SEM）观察生物被膜微观形态结构

在无菌 24 孔板上，用镊子将 14 mm 的圆形爬片放入孔中，每孔加入 1 mL 2.2.2 制备的试验菌悬液，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下分别恒温静置厌氧培养至 12、36、48、72 h，使用无菌移液枪吸弃各孔的培养基和浮游菌，用生理盐水轻洗 1-3 遍后，加入 1 mL 2.5% 戊二醛固定液（电镜专用）于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定一晚。吸弃固定液后，分别用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 浓度梯度乙醇对各孔进行洗脱，各梯度浓度每孔共洗脱 2 次，每次 15 min。最后用 100% 乙醇脱水 2 次，每次 30

min。弃去各孔中所有溶液，加入 100%叔丁醇置换乙醇两次，每次 30 min。将脱水完成的各样品进行冷冻真空干燥后，将待测样品用导电胶粘在载物台上，采用真空离子溅射仪对各样品进行喷金处理 90s 后，置于扫描电子显微镜中并拍摄图片。

2.3 实验结果及讨论

2.3.1 具核梭杆菌受试菌株生物被膜生长动力曲线

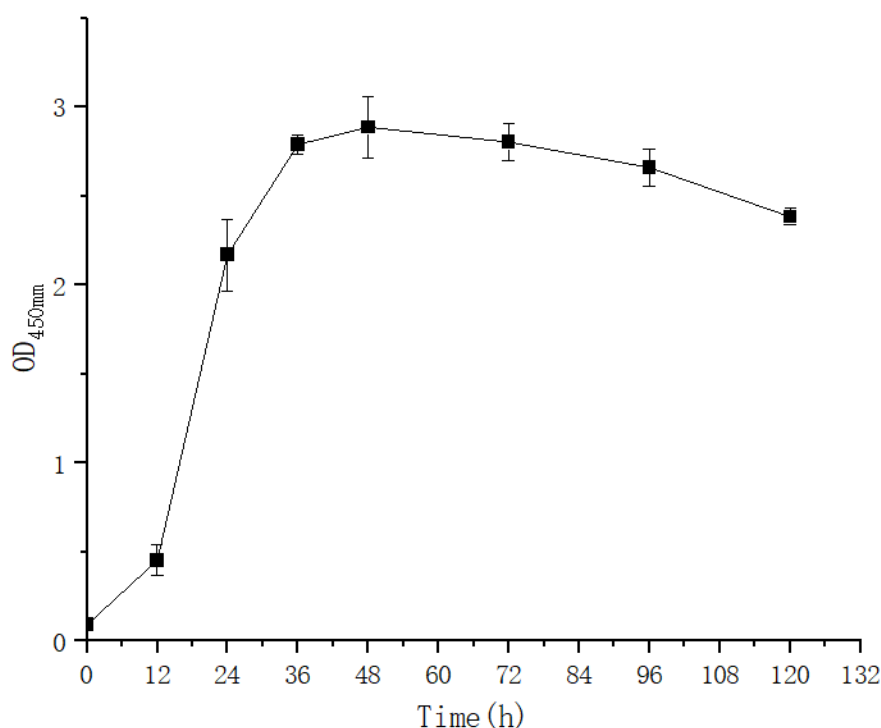


图 2-1 具核梭杆菌生物被膜生长动力曲线图

由图 2-1 可知，受试菌株在 0-36 h 段快速繁殖，对应生物被膜的黏附期；在 36-48 h 时细菌不断聚集成菌落，对应生物被膜的聚集期；在 48-96 h 细菌活细胞量基本保持不变，对应生物被膜的成熟期，此时菌落继续扩大并形成致密的成熟生物被膜。96 h 后，细菌活细胞量下降，进入生物被膜成熟末期，此时膜内细菌的代谢活性降低并开始从膜内脱落并扩散，进入下一轮循环。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/437044054200006062>