

葡萄籽原花青素对变形链球菌的体外抗菌活性研究

汪晶¹, 汪辉²

(1. 南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037; 2. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究葡萄籽原花青素(Grape seed procyanidins, GSPC)对变形链球菌的体外抗菌活性, 探讨其防龋潜能。方法 采用微量肉汤法测定最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)、最低抑制生物膜浓度(MBIC); 采用结晶紫半定量法测定生物膜生成量; 硫酸-蒽酮法测定产糖量, pH 计测定产酸量。结果 葡萄籽原花青素的 MIC 值 12.5 mg/mL; MBC 值和 MBIC 值均为 50 mg/mL; GSPC(≥ 12.5 mg/mL)降低变形链球菌生物膜的生成量, 8 倍 MIC 浓度(100 mg/mL)时抑制率达 76%; GSPC 在低于 MIC 浓度时仍具有抑制变形链球菌产糖、产酸能力。结论 葡萄籽原花青素具有对变形链球菌的体外抗菌活性, 并能抑制变形链球菌的生物膜和致龋毒力因子。

关键词:葡萄籽原花青素; 变形链球菌; 体外抗菌活性; 生物膜

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2017)02-0173-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0173

Antibacterial Activities of Grape Seed Procyanidins Against *Streptococcus Mutans* in Vitro

WANG Jing¹, WANG Hui²

¹ College of Chemical Engineering Nanjing Forestry University Nanjing 210037 China ² Life Science and Technology College China Pharmaceutical University Nanjing 210009 China

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the antibacterial activity of grape seed procyanidins (GSPC) against streptococcus mutans in vitro and to explore its anti-carries potential. **METHODS** Broth micro-dilution method was used to determine minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) and minimal biofilm inhibitory concentration (MBIC); crystal violet semi-quantitative method was used to determine biofilm-formation; anthrone sulfuric acid method was used to test glucan production and pH was used to test acid generation. **RESULTS** MIC value of GSPC was 12.5 mg/mL while MBC value and MBIC value were both 50 mg/mL. GSPC (≥ 12.5 mg/mL) could reduce biofilm formation, and especially when its content increased to eight times of MIC content(100 mg/mL), the inhibition rate was able to achieve 76%. Also it had the ability of inhibiting the glucan production and acid generation at lower content than that of MIC. **CONCLUSION** GSPC shows antibacterial activity and inhibitory effects on biofilm-formation and cariogenic virulence factors against streptococcus mutans in vitro.

KEY WORDS: grape seed procyanidins (GSPC); streptococcus mutans; antibacterial activity; in vitro; biofilm

龋病是发生于牙硬组织的细菌感染性疾病, 发病率高, 严重危害人类口腔健康。变形链球菌 *Streptococcus mutans* 为革兰氏阳性球菌, 是目前公认的口腔中最重要的致龋菌。变形链球菌可利用胞外多糖组成细胞外粘性基质, 形成三维立体的生物膜结构, 牙菌斑生物膜是细菌附着和凝聚以及进行细胞间物质交流的场所, 对菌体具有保护作用, 使菌体对药物和宿主免疫防御具有极强的抵抗力, 生物膜对变形链球菌的生存及进一步发挥其致龋毒力起着至关重要的作用^[1]。葡萄 *Vitis vinifera* L. 古

称蒲陶, 其果、根、藤皆可入药。我国历代医药典籍对葡萄的药用均有论述。中医认为, 葡萄味甘微酸、性平, 具有补肝肾、益气血、开胃力、生津液和利小便之功效。近年来, 随着对葡萄的研究不断深入和扩大, 人们发现葡萄籽也具有很高的营养价值和药用价值, 葡萄籽提取物是从葡萄籽中提取的有效活性营养成分, 主要成分是原花青素, 属于多酚类物质, 具有抗氧化、清除自由基、提高人体免疫力、抗肿瘤等功效^[2], 而且符合人们回归自然的要求, 广泛应用于食品、医药及化妆品等方面。本实验研究葡萄籽

原花青素(Grape seed procyanidins, GSPC)对变形链球菌的抑菌活性和对其生物膜的抑制作用,旨在寻找预防和和治疗龋齿的天然活性物质,同时为葡萄籽原花青素开发出新的功效。

1 材料

1.1 实验菌株与培养基

变形链球菌 *Streptococcus mutans* ATCC 25175;脑心浸出液肉汤(BHI 肉汤),青岛海博生物技术有限公司;琼脂粉,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 材料与试剂

葡萄籽原花青素(Grape seed procyanidins, GSPC):葡萄籽粗提物经 AB-8 树脂精制而成,红棕色粉末,原花青素含量 96.5%^[3];无菌生理盐水,自制;96 孔板,康宁公司。甲醇、冰乙酸、氟化钠、葡萄糖、葱酮、浓硫酸等,国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器

高压灭菌锅(日本三洋公司);细菌培养箱(上海福玛实验设备有限公司);厌氧袋(日本三菱瓦斯化学株式会社);酶标仪(iMARK,美国 BIO-RAD 伯乐有限公司);pH 计(雷磁 HHS-3C,上海仪电科学仪器股份有限公司);上海精密仪器仪表公司;超净工作台,苏州金净公司。

2 方法

2.1 GSPC 对变形链球菌 MIC 和 MBC 的测定

2.1.1 变形链球菌活化和菌液制备 取 -80 °C 保存的变形链球菌划线接种至 BHI 琼脂培养基平板,37 °C 厌氧培养 24 h,挑取单菌落至 BHI 肉汤,37 °C 厌氧培养 12 h,将菌液稀释至 10⁶ CFU/mL。

2.1.2 MIC 的测定 采用微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)。将葡萄籽原花青素(GSPC)用 BHI 肉汤溶解,经 0.22 μm 的滤膜过滤,除菌和除去不溶性物质,用 BHI 肉汤二倍系列稀释。96 孔板的每孔加入稀释菌液 20 μL,再加入 GSPC 的 BHI 稀释液 180 μL,每孔 GSPC 终浓度依次为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 mg/mL。37 °C 厌氧培养 12 h,肉眼观察,未见浑浊的各孔药物浓度中的最低浓度即为 MIC 值。

2.1.3 MBC 的测定 从上述未见浑浊的各孔中吸取 100 μL 培养物涂布于 BHI 琼脂培养基平板,37 °C 厌氧培养 24 h,计数平板菌落数,不大于 5 个的最低药物浓度即为最低杀菌浓度(Minimal bactericid-

al concentration, MBC)。

2.2 GSPC 对变形链球菌生物膜的影响

2.2.1 变形链球菌生物膜模型的制备^[4] 变形链球菌接种至 BHI 肉汤中过夜厌氧培养,用 BHI 肉汤调菌液至 1×10⁷ CFU/mL,96 孔板的每孔加入 200 μL 菌液,37 °C 厌氧培养 24 h,吸出菌液。

2.2.2 MBIC 的测定 采用微量肉汤稀释法测定最低抑制生物膜浓度(Minimal biofilm inhibitory concentration, MBIC)^[5]。在变形链球菌生物膜 96 孔板模型各孔中,加入 GSPC 的系列浓度 BHI 稀释液 200 μL。37 °C 厌氧培养 24 h,肉眼观察各孔的浑浊程度,未见浑浊的最低药物浓度为 MBIC 值。

2.2.3 GSPC 对变形链球菌生物膜生成量的影响 采用结晶紫半定量法测定生物膜的量^[5]。GSPC 用 BHI 肉汤稀释为 8×、4×、2×、1×MIC 的浓度,以 BHI 肉汤为阴性对照,以氟化钠(NaF)作为阳性对照。在变形链球菌生物膜 96 孔板模型各孔中,加入各浓度 GSPC 的 BHI 稀释液 200 μL,每浓度平行做 4 孔,37 °C 培养 24 h。弃去各孔培养物,无菌生理盐水洗涤 3 次,每孔加入 200 μL 甲醇固定 15 min,弃去甲醇,晾干。每孔加入 0.2 mL 的 0.1% 结晶紫溶液染色 5 min,流水洗去未附着的结晶紫染液,室温干燥,加入 160 μL 的冰乙酸,室温下静置 1 h 复溶,用酶标仪测定 570 nm 波长的吸光度(OD 值)。计算,生物膜形成百分比(%)=[(OD/OD₀)×100%],其中 OD、OD₀ 分别为 GSPC 处理孔、阴性对照孔吸光度的平均值。

2.3 GSPC 对变形链球菌致龋毒力因子的影响

2.3.1 GSPC 对变形链球菌产酸能力的影响^[6] 接种变形链球菌到 BHI 肉汤,37 °C 厌氧培养 24 h。菌液离心洗涤 3 次,弃上清,菌体沉淀用适量无菌生理盐水制备成 540 nm 的吸光值(OD_{540 nm})为 1.0 的菌悬液。

用含 1% 葡萄糖的 BHI 肉汤将 GSPC 系列稀释,取 GSPC 稀释液 9 mL 与菌液 1 mL 混合,使浓度依次为 1/2×、1/4×、1/8×MIC,以 NaF 作为阳性对照,以含 1% 蔗糖的 BHI 肉汤为阴性对照。37 °C 厌氧培养 24 h。离心取上清液,用精密 pH 计测量 pH,每组重复测定 3 次,计算平均值,求出 pH 的变化,即 ΔpH=终末 pH-初始 pH。

2.3.2 GSPC 对变形链球菌产糖能力的影响^[7] 用含 2% 蔗糖的 BHI 肉汤将 GSPC 稀释,取 GSPC 稀释液 9 mL 与菌液 1 mL 混合,使浓度依次为 1/2×、

1/4×、1/8×MIC,以NaF作为阳性对照,以含2%蔗糖的BHI肉汤为阴性对照。37℃培养24h。以葡萄糖为标准品,用硫酸-萘酚法测定水不溶性葡聚糖含量,计算GSPC对变形链球菌产不溶性葡聚糖的抑制率。计算公式如下:产不溶性葡聚糖抑制率(%)=(对照组-实验组)/对照组×100%。

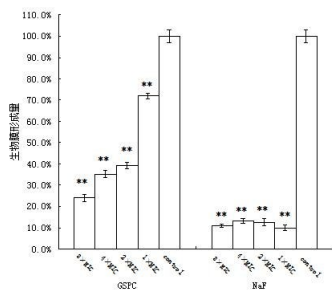
3 结果

3.1 GSPC对变形链球菌MIC和MBC的测定结果

GSPC对变形链球菌ATCC 25175的MIC值为12.5 mg/mL, MBC值为50 mg/mL, MBC值是MIC值的4倍,说明GSPC对浮游状态的变形链球菌具有抑制和杀灭作用。

3.2 GSPC对变形链球菌生物膜的影响

GSPC的MBIC值为50 mg/mL,与MBC值相当,是MIC值的4倍。说明生物膜对细菌具有保护作用,同样浓度下,GSPC(50 mg/mL)可杀死浮游菌,但对生物膜内的变形链球菌仅显示抑菌作用。随着药物浓度升高,变形链球菌的生物膜生成量均显著减少($p < 0.05$),氟化钠对生物膜的抑制率较高,达到80%以上;GSPC在1×MIC浓度下即显示对生物膜的抑制作用,且抑制率随浓度升高而逐渐上升,呈现一定的量效关系,8倍MIC浓度(100 mg/mL)时抑制率达76%。见图1。



注:与阴性对照比较, * $p < 0.05$ 。

图1 不同浓度GSPC对变形链球菌生物膜形成量的影响

3.3 GSPC对变形链球菌致龋毒力因子的影响

变形链球菌的毒力因子包括产糖、产酸等。亚抑菌浓度的GSPC均显示 Δ pH减小、水不溶性多糖产量下降,与不含药的阴性对照组相比具有显著性差异,说明GSPC具有抑制变形链球菌产酸、产糖的作用。见表1~2。

4 讨论

各种口腔微生物中,变形链球菌是牙菌斑的主要致病菌之一,是致龋菌的主要病原体,抑制变形链球菌的生长和生物膜形成是控制龋病的重要环节。

已有研究报道茶多酚、厚朴酚、蜂胶等具有较强防龋作用的天然药物^[7-8],原花青素的抑菌和抑制生物膜活性也开始受到关注^[9]。

表1 不同浓度GSPC条件下变形链球菌的pH值变化($\bar{x} \pm s$)

药物	MIC	0 h	24 h	Δ pH
GSPC	1/2×	6.21±0.03	5.02±0.14*	1.18
	1/4×	6.40±0.05	4.22±0.11*	2.18
	1/8×	6.50±0.06	3.32±0.10	3.17
	1/2×	6.90±0.03	6.88±0.02*	0.02
NaF	1/4×	6.93±0.03	6.82±0.05*	0.11
	1/8×	6.92±0.04	6.38±0.05*	0.54
阴性对照	0	6.91±0.03	3.24±0.11	3.67

注:与阴性对照组比较, * $p < 0.05$ 。

表2 不同浓度GSPC条件下变形链球菌的水不溶性多糖的产糖量变化($\bar{x} \pm s$)

药物	MIC	24 h 产糖量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	产糖抑制率/%
GSPC	1/2×	12.12±0.19*	43.69
	1/4×	15.41±0.21*	28.38
	1/8×	17.71±0.31*	17.71
NaF	1/2×	11.51±0.27*	46.51
	1/4×	13.62±0.28*	36.72
	1/8×	16.20±0.34*	24.73
阴性对照	0	21.52±0.34	

注:药物组与阴性对照组比较, * $p < 0.05$ 。

本实验对葡萄籽原花青素抗变形链球菌的活性进行了综合研究, MIC和MBC值说明其对浮游状态的细菌具有抑菌活性, MBIC和生物膜生成量等指标显示其对生物膜内的细菌也具有明显的抑菌活性,并能够抑制生物膜的生成, pH和产糖量等显示其抑制变形链球菌产酸、产糖能力。结果表明葡萄籽原花青素具有抑制口腔病原微生物的作用。

变形链球菌的毒力因子包括产糖、产酸及在牙面上的粘附能力等,多糖是细菌生物膜的重要成分,同时也介导细菌之间的黏附,形成生物膜;牙菌斑生成过程中pH呈持续降低,说明pH降低也是牙菌斑和龋齿形成的重要原因。抑制变形链球菌的产糖能力,可以有效抑制其生物膜的形成和黏附;抑制pH下降可以有效抗龋。本实验中,葡萄籽原花青素显示了抑制变形链球菌产酸和产糖的能力,说明它可以抑制致龋菌的毒力因子,从而减少龋病的发生。

葡萄籽原花青素可以有效抑制变形链球菌的生长代谢和生物膜,抑制毒力因子,显示其具有预防和

减少龋病发生的潜力,但其具体的作用机制和体内作用效果还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 李晓然,赵今.影响变形链球菌生物膜形成因素的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2011,23(10):956-957,960.
LI XR, ZHAO J. The research progress of factors influencing the streptococcus mutans biofilm formation[J]. Chin J Microecol, 2011, 23(10): 956-957, 960.

[2] 袁敏,韩莉,裴俊俊.葡萄籽提取物原花青素药理作用研究进展[J].中药材,2005,28(7):632-634.
YUAN M, HAN L, PEI JJ. Pharmacological research progress of procyanidine from grape seed extract[J]. J Chin Med Mater, 2005, 28(7): 632-634.

[3] 李瑞丽.葡萄籽中原花青素的提取工艺研究[D].北京:北京化工大学,2006.
LI RL. Extraction Technology Study of Grape Seeds Procyanidins [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2006.

[4] ASSAF D, STEINBERG D, SHEMESH M. Lactose triggers biofilm formation by Streptococcus mutans[J]. Inter Dairy J, 2015, 42: 51-57.

[5] LEE KH, KIM BS, KEUM KS, et al. Essential oil of curcuma

longa inhibits streptococcus mutans biofilm formation [J]. J Food Sci, 2011, 76(9): H226-H230.

[6] 陈秀兰.绿茶提取物 EGCG 抑制致龋菌变形链球菌生长、产酸的实验研究[J].湖北科技学院学报(医学版),2014,28(4):283-284.
CHEN XL. Experimental study on the inhibition of the growth and reducing acid production of streptococcus mutans with green tea extracts EGCG[J]. J Hubei Univ Sci Technol; Med Sci, 2014, 28(4): 283-284.

[7] 余志芬.柠檬提取物对变形链球菌致龋相关酶活性及代谢产物的影响[D].天津:天津医科大学,2010.
YU ZF. Effect of Lemon Peel Extracts on a Variety of Cariogenic Enzymes Activity and Metabolic Products of Streptococcus Mutans[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2010.

[8] WASHIO J, MAYANAGI G, TAKAHASHI N. Challenge to metabonomics of oral biofilm; from what are they? To what are they doing? [J]. J Oral Biosci 2010,52(3):225-32.

[9] 朱彩莲,李鸣宇.原花青素对变形链球菌生物膜的体外抑制作用[J].中国微生态学杂志,2016,28(2):163-168.
ZHU CL, LI MY. Effect of proanthocyanidins on the biofilm of Streptococcus mutans *in vitro* [J]. Chin J Microecol, 2016, 28(2): 163-168. (编辑:董宇)

(上接 111 页)

《灵枢经·海论》认为髓海不足会导致目眩。肾藏精,主骨生髓,脑为髓海。故肾精不充,则髓海不足,脑失所养,可发生眩晕耳鸣等症。临床可选左归丸、杞菊地黄丸等,药用熟地、首乌、山药、枸杞子等以补肾填精、益脑止眩^[12]。

参考文献:

[1] 范炳华,王鹏,徐泉珍,等.《黄帝内经》所论之眩晕探析[J].浙江中医杂志,2007,42(12):687-688.
FAN BH, WANG P, XU QZ, et al. Exploration on vertigo discussed in Internal Canon of Yellow Emperor[J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2007, 42(12): 687-688.

[2] 张挺,李其忠.意象思维在中医认识疾病及临床诊疗中的应用[J].南京中医药大学学报(社会科学版),2015,16(3):141-145.
ZHANG T, LI QZ. Application of imagery thinking to recognition and treatment of disease in TCM[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(Social Sci Edit), 2015, 16(3): 141-145.

[3] 丁光迪.诸病源候论校注[M].北京:人民卫生出版社,1994:55.
DING GD. Corrections and Annotations to Treatise on the Origins and Manifestations of Various Diseases[M]. Beijing: People's health publishing house, 1994: 55.

[4] 赵佶.圣济总录[M].北京:人民卫生出版社,1982:409.
ZHAO J. General Records of Holy Universal Relief[M]. Beijing: People's health publishing house, 1982: 409.

[5] 刘庆帮.《内经》阴阳气位观初探[J].南京中医药大学学报(社会科学版),2003,4(2):95-98.
LIU QB. On concept of qi location discussed in Canon of Medicine[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (Social Sci Edit), 2003, 4(2): 95-98.

[6] 杨上善.黄帝内经太素[M].北京:人民卫生出版社,1982:105.
YANG SS. Grand Simplicity of The Yellow Emperor's Inner Classic [M]. Beijing: People's health publishing house, 1982: 105.

[7] 王庆其.内经临床医学[M].北京:人民卫生出版社,2010:279.
WANG QQ. Clinical Medicine of Internal Canon of Yellow Emperor[M]. Beijing: People's health publishing house, 2010: 279.

[8] 麦华超,胡财喜.浅谈“诸风掉眩,皆属于肝”治疗眩晕的临床意义[J].光明中医,2011,26(12):2396-2397.
MAI HC, HU CX. Clinical meaning of "all wind with vertigo and shaking is ascribed to the liver" in treating vertigo[J]. Guangming Tradit Chin Med, 2011, 26(12): 2396-2397.

[9] 叶天士.临症指南医案[M].北京:华夏出版社,1995:27.
YE TS. A Guide to Clinical Practice with Medical Records[M]. Beijing: Huaxia publishing house, 1995: 27.

[10] 李东垣.金元四大家医学全书[M].天津:天津科学技术出版社,1996:585.
LI DY. Complete Medical Works from Four Great Doctors of Jin and Yuan Dynasties[M]. Tianjin: Tianjin science and technology press, 1996: 585.

[11] 王庆其.内经临证发微[M].上海:上海科学技术出版社,2007:451.
WANG QQ. Clinical Elaboration on the Subtleties of the Yellow Emperor's Inner Classic[M]. Shanghai: Shanghai science and technology press, 2007: 451.

[12] 张觉人,邹亮,李悦,等.髓海不足与填髓益脑的临床思考[J].辽宁中医杂志,2008,35(1):54.
ZHANG JR, ZOU L, LI R, et al. Clinical thought on marrow sea insufficiency and filling essence and nourishing marrow[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2008, 35(1): 54. (编辑:叶亮)