

苦参碱对变形链球菌生物被膜的抑制作用研究

杨若琪¹, 王静¹, 张颖颖^{2*}

(1. 山东中医药大学药学院, 山东济南 250355; 2. 山东中医药大学中医学院, 山东济南 250355)

摘要 [目的] 评估苦参碱对变形链球菌致龋性(如生长、产酸、生物被膜形成和细菌代谢活性)的影响。[方法] 通过结晶紫染色测定苦参碱对生物被膜形成的抑制作用与已成熟生物被膜的根除作用, 通过 pH 计测定苦参碱对变形链球菌产酸的影响, 通过 MTT 法测定了苦参碱对变形链球菌浮游细胞与生物被膜细胞代谢活性的影响。[结果] 苦参碱能够显著抑制变形链球菌的生长与生物被膜的形成, 对已成熟的生物被膜也有根除作用。苦参碱处理后变形链球菌有机酸的产生明显减少, 同时变形链球菌浮游细胞和生物被膜细胞的代谢活性也受到了抑制。[结论] 苦参碱可以抑制致龋性生物被膜, 是预防龋齿的候选药物之一。

关键词 苦参碱; 变形链球菌; 生物被膜; 抑制作用

中图分类号 R 285 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)09-0168-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.09.045



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Inhibitory Effect of Matrine on the Biofilm of *Streptococcus mutans*

YANG Ruo-qi¹, WANG Jing¹, ZHANG Ying-ying² (1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355)

Abstract [Objective] To evaluate the effect of matrine on the cariogenicity of *Streptococcus mutans* (such as growth, acid production, biofilm formation and bacterial metabolic activity). [Method] The inhibitory effect of matrine on the formation of biofilms and the eradication of mature biofilms were measured by crystal violet staining. The effect of matrine on the acid production of *S. mutans* was measured by a pH meter. The effect of matrine on the metabolic activities of *S. mutans* planktonic cells and biofilm cells was determined by MTT method. [Result] Matrine could significantly inhibit the growth of *S. mutans* and the formation of biofilms, and it could also eradicate mature biofilms. After treatment with matrine, the production of organic acids by *S. mutans* was significantly reduced, and the metabolic activities of its planktonic cells and biofilm cells were also inhibited. [Conclusion] Matrine can inhibit cariogenic biofilms and is one of the candidate drugs for preventing dental caries.

Key words Matrine; *Streptococcus mutans*; Biofilm; Inhibitory effect

尽管如今的牙科技术发展迅速,但是许多人依然无法摆脱牙齿疾病的痛苦。有数据显示,牙齿疾病每年给全球造成的经济损失高达 2 980 亿美元,占全球医疗总支出的 4.6%^[1]。龋齿是目前最常见的牙齿疾病之一。变形链球菌(*Streptococcus mutans*)是一种革兰氏阳性细菌,被认为是主要的致龋病原体^[2]。变形链球菌能够代谢食物中的糖类并产生有机酸,从而腐蚀牙釉质的表面,导致龋齿的形成^[3]。同时,变形链球菌在牙齿表面形成的生物被膜(也称为牙菌斑)也是引起龋齿的重要原因之一^[4]。

生物被膜是包裹在自身产生的胞外聚合物基质中的微生物聚集体。牙齿生物被膜的形成是一个复杂的过程,变形链球菌首先黏附在牙齿的表面,随后进行定殖并与其他口腔细菌聚集形成牙菌斑^[5]。在这个过程中,变形链球菌通过葡糖基转移酶(GTFase)合成水不溶性葡聚糖,为细菌在牙齿表面的黏附提供了结合位点,并促进了生物被膜的形成^[6]。生物被膜中的细菌通常表现出与浮游细菌完全不同的特性,例如对抗菌药物耐药性的增强^[7]。因此,抑制牙齿生物被膜的形成是龋齿预防的主要策略之一。

氟化物在龋齿的预防上起着重要的作用,但高浓度的氟化物具有细胞毒性^[8]。洗必泰也是一种常用的抗龋药物,然而频繁使用洗必泰会加速牙结石的形成^[9]。近年来,人们对

天然产物用作新型抗龋药物的兴趣日益增加。与传统的抗龋药物相比,天然产物具有良好的效果,并且细胞毒性较低,更适合临床应用。

苦参碱是豆科植物苦参(*Sophora flavescens* Ait)、苦豆子(*S. alopecuroides* L.)、广豆根(*S. subprostrata* Chun et T. Chen)等中草药的活性成分,是苦参碱类生物碱的代表,这一类生物碱是一种具有四环喹啉啶类结构的生物碱,还包括氧化苦参碱、槐果碱、槐醇碱、槐胺碱、氧化槐果碱等^[10],苦参碱的生物活性十分广泛,具有抗菌^[11]、抗病毒^[12]、抗炎^[13]、免疫调节^[14]、抗肿瘤^[15]等作用。有研究表明,苦参碱在抗菌方面具有良好的活性,能够抑制大肠埃希菌^[16]、表皮葡萄球菌^[17]和结核杆菌^[18]等细菌的生长,但对苦参碱作用于口腔主要致龋细菌——变形链球菌的相关研究较少。该试验探究了苦参碱对变形链球菌生长、产酸、生物被膜以及代谢活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料 苦参碱(上海源叶生物科技有限公司);变形链球菌(*S. mutans*) UA159,由山东中医药大学微生物教研室提供;BHI 培养基(批号 20190508,北京奥博星生物技术有限公司)。

1.2 主要仪器设备 一次性无菌培养皿(直径 90 mm,新星实验器材公司);苏净安泰 BSC-1300IIA 生物洁净安全柜(苏净集团);麦氏比浊管(自制);96 孔板(新星实验器材公司);普朗 DNM-9602 酶标仪(北京普朗公司);pH 计(上海虹益仪器仪表有限公司,型号 PHS-3C);PBS(福州飞净生物科技有限公司);MTT(江苏凯基生物技术有限公司,5 mg/mL)。

基金项目 山东省研究生导师指导能力提升计划(SDY18043);山东省中医药管理局课题(2017-026,2019-0027)。

作者简介 杨若琪(1996—),男,山东东营人,硕士研究生,研究方向:中药抗细菌生物被膜。*通信作者,副教授,硕士,硕士生导师,从事中医药抗病原生物研究。

收稿日期 2020-10-19

1.3 试验方法

1.3.1 抗菌活性测定。通过微量稀释法测定苦参碱的抗菌活性。将 90 μL 含有 1% 葡萄糖的 BHI 培养基添加到 96 孔板的每个孔中。然后将配制好的苦参碱溶液进行 2 倍连续稀释,使之浓度为 10.00、5.00、2.50、1.25 mg/mL,并设置空白对照。向每个孔中添加 10 μL 在 BHI 培养基中过夜生长的变形链球菌 UA159 菌液(0.05OD, 600 nm)。将 96 孔板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下无氧培育 24 h。最后在 630 nm 处测定 OD 值,结果取 3 次测定数值的平均值。

1.3.2 产酸试验。为了测定苦参碱对变形链球菌产酸的影响,按照“1.3.1”所述分组进行药液的稀释与细菌的接种。培育 24 h 后,使用 pH 计测量每个孔的 pH。在接种变形链球菌之前,还测量含有各种浓度苦参碱的 BHI 培养基的初始 pH。每个浓度平行测定 3 次,结果取平均值。

1.3.3 结晶紫染色。通过结晶紫染色法测定苦参碱对生物被膜形成的抑制作用。将变形链球菌 UA159 的过夜培养物加入含有不同浓度苦参碱(1.25、2.50、5.00、10.00 mg/mL)的 BHI 肉汤中(同时设立空白对照)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下无氧培育 24 h 后,用无菌 PBS 轻轻洗去多余的培养基和浮游细菌。随后使用无水甲醇固定生物被膜 15 min,并晾干。加入 0.2% 的结晶紫(CV)溶液染色。10 min 后,弃去多余的染料,用无菌 PBS 冲洗 2 次,向每个孔中加入 33% 的乙酸溶液,以溶解用于染色生物被膜的结晶紫。最后在 630 nm 下测定 OD 值,结果取 3 次测定数值的平均值。

为了测定苦参碱对已成熟生物被膜的根除作用,需要在 96 孔板中建立 24 h 生物被膜模型。具体方法:将过夜培养的变形链球菌 UA159 菌液添加到含有 1% 葡萄糖的 BHI 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下无氧培育 24 h 后,小心除去浮游细菌,并用无菌 PBS 洗涤形成的生物被膜。将各种浓度的苦参碱添加到每个孔中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下无氧培育 24 h,随后按照上述步骤进行染色,测定结果。

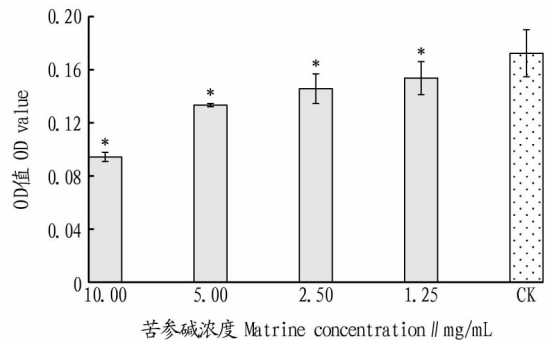
1.3.4 MTT 试验。通过 MTT 法测定苦参碱对变形链球菌浮游细胞代谢活性的影响。将变形链球菌 UA159 在含有 10.00、5.00、2.50、1.25 mg/mL 苦参碱的 BHI 肉汤中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下无氧培育 4 h(含空白对照)。然后向每个孔中添加 10 μL 5 mg/mL 的 MTT,将 96 孔板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下无氧培育 4 h。最后每孔加入 100 μL 100% 的 DMSO 溶液,振荡培育 10 min。使用酶标仪测量 490 nm 处的 OD 值,每组试验重复 3 次,结果取平均值(代谢活性=试验组 OD 值/对照组 OD 值 \times 100%)。

为了测定苦参碱对变形链球菌生物被膜细胞代谢活性的影响,如“1.3.3”所述建立 24 h 生物被膜模型,与各种浓度的苦参碱共同无氧培育 24 h 后,小心除去含有苦参碱的 BHI 培养基,并用无菌 PBS 再次洗涤形成的生物被膜,随后按照上述步骤进行 MTT 检测。

2 结果与分析

2.1 苦参碱对变形链球菌浮游细胞生长的抑制作用 从图 1 可以看出,当苦参碱浓度增大时,变形链球菌的生长受到明显的抑制;苦参碱对变形链球菌的最小抑菌浓度(MIC)为

10.00 mg/mL;各个浓度和对照组相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明苦参碱对变形链球菌具有较强的抗菌作用,能够显著抑制变形链球菌浮游细胞的生长。



注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$

Note: * . Compared with the control group, $P < 0.05$

图 1 苦参碱对变形链球菌浮游细胞生长的抑制活性

Fig. 1 The inhibitory activity of matrine on the growth of *Streptococcus mutans* planktonic cells

2.2 苦参碱对变形链球菌产酸的影响 用各种浓度(1.25~10.00 mg/mL)的苦参碱处理细菌,并测量 pH 的变化,以确定苦参碱是否抑制变形链球菌的产酸。结果如表 1 所示,在细菌培养前,对照组培养液的起始 pH 为 6.89,无氧培育 24 h 后,培养液的 pH 显著降低至 5.19;当用 1.25 和 2.50 mg/mL 的苦参碱处理后,pH 的下降有所减少;用 5.00 和 10.00 mg/mL 的苦参碱处理后,pH 的下降受到明显的抑制。结果表明苦参碱可以抑制变形链球菌产生有机酸。

表 1 苦参碱处理前后 pH 的变化

Table 1 Changes of pH before and after matrine treatment

浓度 Concentration mg/mL	处理前 Before treatment	处理后 After treatment	变化 Change
10.00	7.99 \pm 0.04*	7.08 \pm 0.22**	0.91 \pm 0.19**
5.00	7.57 \pm 0.03*	6.61 \pm 0.07**	0.96 \pm 0.08**
2.50	7.14 \pm 0.16*	5.83 \pm 0.25*	1.31 \pm 0.20**
1.25	6.79 \pm 0.04*	5.42 \pm 0.17*	1.37 \pm 0.20*
CK	6.89 \pm 0.24	5.19 \pm 0.18	1.70 \pm 0.06

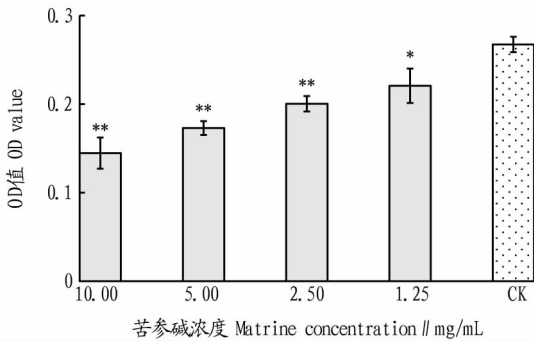
注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; ** 表示与对照组相比, $P < 0.01$

Note: * . Compared with the control group, $P < 0.05$; ** . Compared with the control group, $P < 0.01$

2.3 苦参碱对变形链球菌生物被膜形成的抑制作用 从图 2 可以看出,当苦参碱浓度增大时,对应的 OD 值随之降低,说明变形链球菌生物被膜的生物量逐渐减少,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明苦参碱对变形链球菌生物被膜的形成具有良好的抑制作用,且作用效果是呈浓度依赖性。

2.4 苦参碱对变形链球菌已成熟生物被膜的根除作用 与浮游细胞相比,生物被膜中的细胞更难被杀死。试验建立了 24 h 生物被膜模型,通过结晶紫染色测定各种浓度的苦参碱对已成熟生物被膜的根除作用。结果如图 3 所示,随着苦参碱浓度的增加,OD 值逐渐降低,表明生物被膜的数量持续减少;与对照组的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。由此可以

看出,苦参碱可以有效破坏已形成的生物被膜。

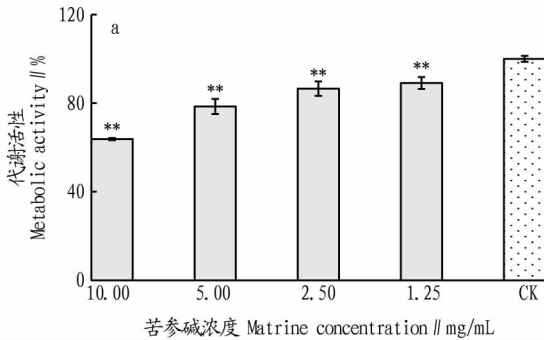


注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; ** 表示与对照组相比, $P < 0.01$
Note: * . Compared with the control group, $P < 0.05$; ** . Compared with the control group, $P < 0.01$

图2 苦参碱对变形链球菌生物被膜形成的抑制作用

Fig. 2 The inhibition effect of matrine on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*

2.5 苦参碱对变形链球菌浮游细胞和生物被膜细胞代谢活性的影响 通过 MTT 法测定各种浓度的苦参碱对变形链球菌浮游状态下和生物被膜状态下代谢活性的影响。用 10.00、5.00、2.50、1.25 mg/mL 的苦参碱在 BHI 培养基中处



注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; ** 表示与对照组相比, $P < 0.01$
Note: * . Compared with the control group, $P < 0.05$; ** . Compared with the control group, $P < 0.01$

图4 苦参碱对变形链球菌浮游细菌(a)和生物被膜(b)代谢活性的影响

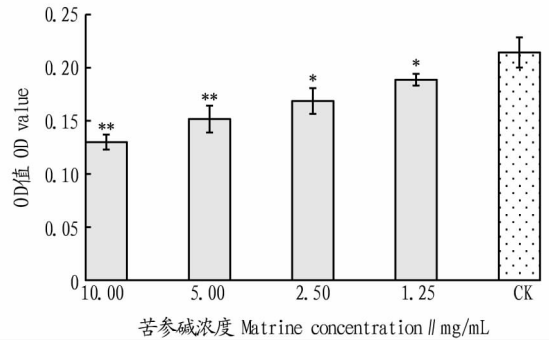
Fig. 4 The effect of matrine on the metabolic activity of planktonic bacteria (a) and biofilm (b) of *Streptococcus mutans*

3 结论与讨论

变形链球菌是引起龋齿的主要致病菌,因此控制变形链球菌在口腔中的生长非常重要。该试验综合研究了苦参碱对变形链球菌的抑制作用,结果表明,苦参碱可抑制变形链球菌的生长,拮抗其产生有机酸,分散变形链球菌生物,并能降低其细胞代谢活性。

在牙菌斑形成的过程中, pH 是主要的影响因素之一。变形链球菌通过糖酵解途径产生的有机酸会降低牙菌斑的 pH,使牙釉质脱矿并引起龋齿^[19]。因此, pH 的变化可以作为确定抗龋药物效果的指标。经过试验发现,苦参碱抑制了变形链球菌引起的 pH 降低,说明在苦参碱的作用下,变形链球菌产生的有机酸减少。该结果与 Kim 等^[20]用甘菊挥发油对变形链球菌产酸的抑制效果类似。

生物被膜是一类结构和组成非常复杂的细菌群落,与浮游细胞相比,生物被膜中的细菌细胞需要更高浓度的药物才

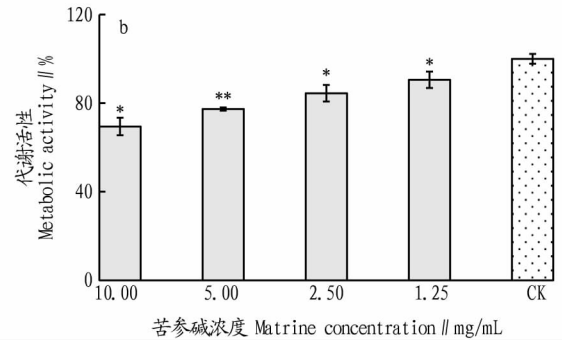


注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; ** 表示与对照组相比, $P < 0.01$
Note: * . Compared with the control group, $P < 0.05$; ** . Compared with the control group, $P < 0.01$

图3 苦参碱对变形链球菌已成熟生物被膜的根除作用

Fig. 3 The eradication effect of matrine on the mature biofilm of *Streptococcus mutans*

理变形链球菌的浮游细胞或生物被膜细胞,使用 DMSO 溶解形成的甲贍结晶。MTT 试验结果(图 4)表明,与未处理的对照组相比,苦参碱以浓度依赖性的方式降低了变形链球菌浮游细胞和生物被膜细胞的代谢活性,与对照组的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



能杀死,这是因为胞外聚合物基质为生物被膜中的细菌细胞提供了保护作用^[21]。变形链球菌在牙齿表面形成的生物被膜创造了一个厌氧和酸性的环境,从而加速了龋齿的形成^[22]。因此,阻碍牙齿生物被膜的形成是控制龋齿的有效方法。已有研究发现,一些来源于植物的化合物对变形链球菌具有抗生物被膜活性,例如来源于姜黄根茎的姜黄素^[23]和梗树果实的柚皮素^[24]。在该研究中,通过结晶紫染色法评估了苦参碱是否会影响变形链球菌生物被膜的形成,结果显示,苦参碱以浓度依赖性的方式抑制了变形链球菌生物被膜的形成。成熟的生物被膜具有更强的存活能力,一旦生物被膜形成并黏附在物体表面上,根除生物被膜将变得非常困难^[25]。该研究通过建立 24 h 生物被膜模型来测定苦参碱对已成熟生物被膜的影响,结果显示,苦参碱能够分散预先形成的变形链球菌生物被膜。

细胞代谢活性可能在生物被膜形成的过程中起着关键

作用。MTT 法是基于将四氮唑盐还原为甲臜的原理,以确定微生物和哺乳动物细胞的活力。Khan 等^[26]研究发现牛至中的香芹酚通过降低变形链球菌的代谢活性以抑制生物被膜的形成。同样该研究的结果表明,苦参碱可以显著影响变形链球菌浮游细胞和生物被膜细胞的代谢活性,从而进一步验证了苦参碱对变形链球菌的抗菌作用和抗生物被膜能力。

该试验结果表明,苦参碱对变形链球菌的生长、代谢及其生物膜的形成都有一定的抑制作用。由此可见,苦参碱有作为新型抗龋药物开发的潜力,如将其开发为含漱液等类型非口服制剂,可望有较好的抗龋齿效果,亦可避免其毒性对人体产生影响。当然,在苦参碱应用于口腔龋齿治疗之前,应对其毒性进行充分检测,确定其安全剂量。同时,以分子生物学等手段开展进一步具体研究,以确定苦参碱治疗和预防龋齿的分子机制。

参考文献

[1] LISTL S, GALLOWAY J, MOSSEY P A, et al. Global economic impact of dental diseases[J]. Journal of dental research, 2015, 94(10): 1355-1361.

[2] LOESCHE W J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay[J]. Microbiological reviews, 1986, 50(4): 353-380.

[3] QUIVEY R G JR, KUHNERT W L, HAHN K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci[J]. Critical reviews in oral biology and medicine, 2001, 12(4): 301-314.

[4] NYVAD B, CRIELAARD W, MIRA A, et al. Dental caries from a molecular microbiological perspective[J]. Caries research, 2013, 47(2): 89-102.

[5] WIATER A, CHOMA C, SZCZODRAK J. Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: A structural study[J]. Journal of basic microbiology, 1999, 39(4): 265-273.

[6] ZHAO W, LI W Q, LIN J C, et al. Effect of sucrose concentration on sucrose-dependent adhesion and glucosyltransferase expression of *S. mutans* in children with severe early-childhood caries (S-ECC) [J]. Nutrients, 2014, 6(9): 3572-3586.

[7] MERRITT J, KRETH J, QI F X, et al. Non-disruptive, real-time analyses of the metabolic status and viability of *Streptococcus mutans* cells in response to antimicrobial treatments[J]. Journal of microbiological methods, 2005, 61(2): 161-170.

[8] FEATHERSTONE J D B. Remineralization, the natural caries repair process; The need for new approaches[J]. Advances in dental research, 2009, 21(1): 4-7.

[9] ARAUJO N C, FONTANA C R, GERBI M E M, et al. Overall-mouth disin-

fection by photodynamic therapy using curcu min[J]. Photomedicine and laser surgery, 2012, 30(2): 96-101.

[10] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱免疫促进作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 579-585.

[11] 张玉玲, 岳晓琪, 张艳丽. 苦豆子生物碱体外抑菌活性的检测[J]. 轻工科技, 2019, 35(7): 33-34.

[12] 程培培, 李剑勇, 杨亚军, 等. 苦参碱的抗病毒作用研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 7-9.

[13] 智信, 陈晓, 苏佳灿. 苦参碱药理作用研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(1): 123-127.

[14] 李军, 司维柯, 赵宸, 等. 苦参碱与氧化苦参碱影响荷瘤小鼠肿瘤生长及其免疫调节作用的研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(27): 2719-2721.

[15] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱和氧化苦参碱抗大肠癌药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2020, 43(6): 1189-1196.

[16] 秦菊. 苦参碱对大肠埃希菌体外生物膜形成抑制的作用研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2015.

[17] 官妍, 马越, 程惠娟, 等. 苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜作用初探[J]. 微生物学通报, 2011, 38(1): 91-96.

[18] 李洪敏, 冯端浩, 曹晶, 等. 中药苦参碱对结核杆菌的抑制作用[J]. 解放军药学报, 2002, 18(6): 383-385.

[19] KÖHLER B, BIRKED D, OLSSON S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* [J]. Caries research, 1995, 29(5): 402-406.

[20] KIM B S, PARK S J, KIM M K, et al. Inhibitory effects of *Chrysanthemum boreale* essential oil on biofilm formation and virulence factor expression of *Streptococcus mutans* [J]. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2015, 2015: 1-11.

[21] JHAJHARIA K, PAROLIA A, SHETTY K V, et al. Biofilm in endodontics; A review[J]. Journal of international society of preventive & community dentistry, 2015, 5(1): 1-12.

[22] MARQUIS R E. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms [J]. Journal of industrial microbiology, 1995, 15(3): 198-207.

[23] LI B C, LI X L, LIN H C, et al. Curcumin as a promising antibacterial agent; Effects on metabolism and biofilm formation in *S. mutans* [J]. Biomed research international, 2018, 2018: 1-11.

[24] YUE J X, YANG H Y, LIU S Y, et al. Influence of naringenin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans* [J]. Journal of dentistry, 2018, 76: 24-31.

[25] RÖMLING U, BALSALOBRE C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies [J]. Journal of internal medicine, 2012, 272(6): 541-561.

[26] KHAN S T, KHAN M, AHMAD J, et al. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans* [J]. AMB Express, 2017, 7(1): 1-11.

(上接第 167 页)

[6] 曾海涛. 中药黄芪在临床上的药理作用及其应用价值探讨[J]. 北方药学, 2019, 16(10): 126-127.

[7] 刘建兵. 中药黄芪的药理作用及临床应用效果观察[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(70): 141.

[8] 王青, 赵林华, 邸莎. 黄芪的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药, 2018, 38(12): 1450-1454.

[9] 吴云波, 张峻, 门操. 黄芪在临床应用中的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(32): 216, 219.

[10] 王宗权, 贾继明, 裴彩云, 等. 不同生长年限和采收期黄芪药材中 3 种黄芪皂苷的动态积累研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1503-1505.

[11] 张秋海, 丁家欣, 李树莉, 等. 不同生长年限黄芪中黄芪甲苷和多糖含量比较[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(11): 79-82.