

血小板抗表皮葡萄球菌生长的研究^{*}

李贞贞^{a,b}, 徐金梅^a, 顾顺利^a, 张辉洁^a, 胡兴斌^a, 尹文^{a,b}

(第四军医大学 a. 西京医院输血科; b. 基础部微生物学教研室, 西安 710032)

摘要:目的 探讨血小板对表皮葡萄球菌(*staphylococcus epidermidis*, SE)的抗菌效果及相关机制。方法 体外建立 10^5 CFU/ml 表皮葡萄球菌接种浓度的 BHI 培养体系, 分别加入终浓度为 400×10^9 /L 血小板(PLT 组)、血浆(阳性对照组)与 BHI 培养基(阴性对照组)共培养 12 h 以后, 观察比较各组菌液的浑浊程度, 并采用倍比稀释、涂布计数法检测血小板体外抗菌的效果, 同时绘制血小板抗菌曲线。通过透射电镜观察细菌亚显微结构的完整性, 并初步探究血小板的抗菌机制。结果 血小板对表皮葡萄球菌有明显的抑制作用, 且其抑制效果虽较血浆组出现的晚, 但持续时间更久; 透射电镜结果显示血小板抗菌组表皮葡萄球菌染色质结构异常、发生凝集并有部分断裂, 且处于分裂期的细菌比例明显降低。结论 血小板可能通过破坏表皮葡萄球菌染色质的结构, 进而影响细菌的分裂, 发挥抗菌作用。

关键词:血小板; 表皮葡萄球菌; 抗菌; 透射电镜

中图分类号: R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)05-042-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.011

Antibacterial Effect of Platelets on *Staphylococcus Epidermidis*

LI Zhen-zhen^{a,b}, XU Jin-mei^a, GU Shun-li^a, ZHANG Hui-jie^a, HU Xing-bin^a, YIN Wen^{a,b}

(a. Department of Transfusion Medicine, Xijing Hospital;

b. Department of Microbiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: **Objective** To explore the antibacterial effect and mechanisms of platelets (PLT) on *Staphylococcus epidermidis* (SE). **Methods** Built infectious model of SE in vitro, whose final concentration was 10^5 CFU/ml in the reaction. Separately cocultured these models with PLT (the final concentration 400×10^9 /L)-plasma (positive control) and BHI medium 12 hours later, and detected the antibacterial effect of PLT by making a liquid thinner and spreading counting method, and drawing antibacterial curve. Meanwhile, observed the bacterial structure by transmission electron microscope (TEM), and initially explored the antibacterial mechanism of PLT. **Results** The study showed the antibacterial effect of PLT on SE was very obvious, which appeared later than the plasma (M) group, but enduring. The images of TEM showed an electronlight region appeared in the centre of bacterium, contained condensed DNA molecules and led to slower fission. **Conclusion** PLT can damage the DNA structure of SE, and then affect the fission of SE, finally inhibit the proliferation of SE.

Keywords: platelets; *Staphylococcus epidermidis*; antibacterial effect; transmission electron microscope

细菌感染性疾病在医院感染中最为常见^[1,2]。表皮葡萄球菌(*staphylococcus epidermidis*, SE)是人体皮肤和黏膜上定居的正常菌群之一, 通常致病力很弱。但随着人工瓣膜、人工关节等医用高分子材料使用的增多^[3,4], 表皮葡萄球菌已成为医院感染中重要的致病菌^[5]。目前临床针对细菌性感染治疗主要采用抗生素^[6~8], 但随着抗生素的广泛使用, 抗生素的耐药性也越来越严重^[9,10], 尤其多重耐药性“超级细菌”的出现, 对细菌性感染疾病的预防和治疗造成极大威胁。血小板(platelet, PLT)是人体血液的重要组成成分, 其主要功能是参与凝血止血过程。近年研究发现, 其在体内抗感染免疫

中也发挥着重要作用^[11,12]。研究表明血小板可通过参与机体的先天性免疫, 招募其它免疫细胞聚集至感染部位^[13], 血小板自身还可以分泌具有抗菌肽结构的物质^[13~15]。那么血小板是否具有直接的抗菌功能? 其抗菌机制是什么? 本课题以临床感染较多的表面葡萄球菌为模型, 初步探讨了血小板的抗菌作用和机制。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 表皮葡萄球菌 ATCC 12224 由西京医院皮肤科提供。

1.2 主要试剂与仪器 BHI 培养基购于青岛海博有限公司; 血小板制品由西京医院输血科提供。

^{*} 基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划-青年人才项目(NO. 2016JQ8033)。

作者简介: 李贞贞(1988—), 女, 硕士研究生, 检验技师, Tel: 15229360983, E-mail: lizhen 2360504@qq.com。

通讯作者: 尹文, 教授, 博士生导师, 主要从事临床输血相关研究, E-mail: yinwen@fmmu.edu.cn。

胡兴斌, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事临床相关研究, E-mail: hxbyqh@163.com, 为共同通讯作者。

(T012-22)摇床购自苏州培英实验设备有限公司; Sysmex XP-100 全自动血细胞自动分析仪购自日本希森美康有限公司; (UV2550)分光光度计购自日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的活化培养:从表皮葡萄球菌血平板上,用无菌接种环挑取单个菌落接种于 5 ml 的 BHI 培养基中,37℃,225 r/min 培养 10~12 h 后,取 10 μ l 菌液置于 LB 平板,并用接种环三区划线,24 h 后挑取生长状态较好的单菌落,接种于 BHI 培养液中扩增培养 10~12 h,使细菌处于对数期,为后续实验做准备。

1.3.2 血小板制备:将血小板制品(富血小板血浆),3 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液加入到新 15 ml 离心管中备用,加 CGS 液^[16]重悬沉淀,3 000 r/min 离心 10 min 后,弃掉上清,重新加 CGS 液重悬沉淀,并取 100 μ l CGS-PLT 混悬液通过全自动血细胞分析仪进行 PLT 计数,剩余 CGS-PLT 混悬液 3 000 r/min 离心 10 min,取沉淀用 BHI 培养基配成血小板制剂。

1.3.3 细菌生长观察:将对数生长期的表面葡萄球菌培养液调整至 1 OD(1 OD=10⁹ CFU/ml),并依据倍比液体稀释法将菌液浓度调整至 10⁶ CFU/ml,取 600 μ l 稀释后菌液分别接种至加有血小板(PLT 组)、血浆(阳性对照组)及 BHI 培养基(阴性对照组)的培养体系中,使反应体系中细菌的终浓度为 10⁵ CFU/ml,血小板的终浓度为 400×10⁹/L,并于 37℃,225 r/min 培养 12 h 后,对比各试管的浑浊程度,判断表皮葡萄球菌的生长情况。

1.3.4 生长曲线绘制:取活化的表面葡萄球菌培养液,以 10⁶ CFU/ml 终浓度分别接种于血浆组、

终浓度为 400×10⁹/L 的血小板组,以及 BHI 培养基组,补加 BHI 培养液使终体积至 6 ml,于 37℃,225 r/min 培养,取不同时间点的培养菌液 100 μ l,倍比稀释法稀释 10⁹ 倍,并取稀释后的菌液 20 μ l 进行涂板,将涂布平板置于 37℃ 恒温培养箱中过夜培养 24 h 后,计数,并绘制生长曲线。

1.3.5 透射电镜观察:取共培养 12 h 后的 BHI 培养液组、血浆组以及 PLT 组细菌培养液各 200 μ l,8 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清,取沉淀,依照以下步骤^[17]进行电镜样本的制备:①前固定加 2.5 ml/dl 的戊二醛放置 4℃,静置 4 h;②经 0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次,10 min/次;③后固定:1 ml/dl 锇酸固定 2 h,0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次,5 min/次;④脱水:50 ml/dl,70 ml/dl 乙醇逐级脱水,每级 10 min,80 ml/dl,90 ml/dl,100 ml/dl 丙酮逐级脱水 2 次,10 min/次;⑤置换:100 ml/dl 丙酮:环氧树脂 Epon812 包埋剂以 1:1 混合,置换 40 min;⑥浸透:环氧树脂 Epon812 包埋剂 37℃ 浸透过夜;⑦包埋:将样品置于 Epon812 包埋剂内,60℃ 聚合 48 h。⑧切片:在超薄切片机上切成厚度 70 nm 左右的超薄切片,用铜网捞片后送第四军医大学电镜室进行透射电镜检测。

1.4 统计学分析 本实验所有数据运用 Graph-Pad prism 5 统计分析软件进行分析,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板抑制细菌生长现象的观察 比浊法观察血小板抗表皮葡萄球菌的效果,各组培养 12 h 后的效果图,如图 1,可以看出血小板抗表皮葡萄球菌的效果显著,其培养液浑浊度较低,PLT 组抗菌效果明显优于血浆组。

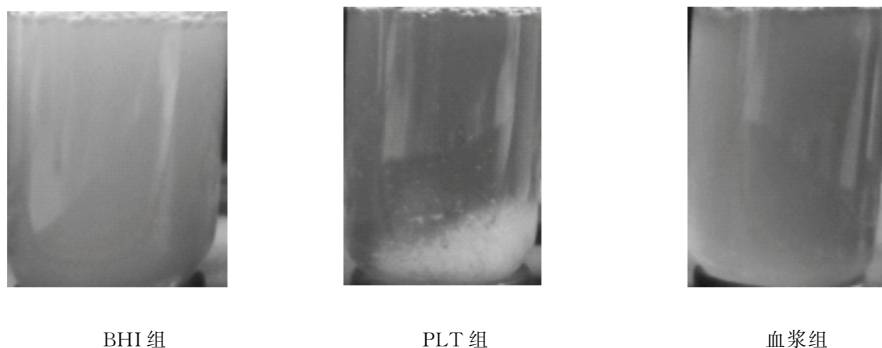


图 1 血小板抗表皮葡萄球菌的效果检测图

2.2 血小板对细菌生长曲线的影响 取 PLT 组、血浆组及 BHI 培养液组培养 1,2,3,4,5,6,8,10,12,14,16,18 和 20 h 后的菌液 100 μ l,倍比稀释后分别取 20 μ l 进行涂板计数,并绘制生长曲线,见图 2。可以看出 PLT 和血浆组,从共培养 3 h 后开

始出现抗菌效果,培养 10 h 以后,PLT 组抗菌效果逐渐优于血浆组,并在培养 12~16 h 后保持稳定的抗菌状态,此时,血浆组细菌增殖逐渐恢复。此结果经 *t* 检验方差分析比较,差异有统计学意义(见图 3)。

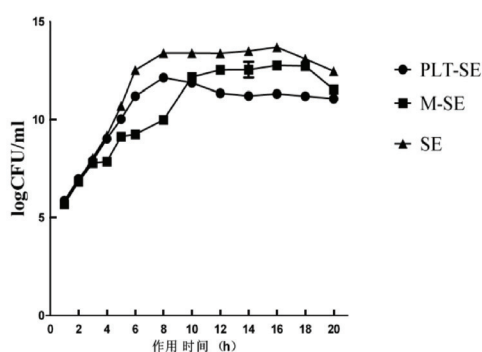
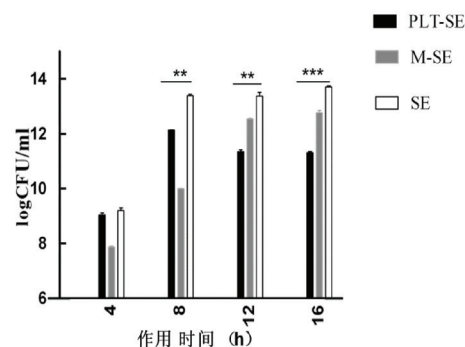


图2 血小板对表皮葡萄球菌生长曲线的影响

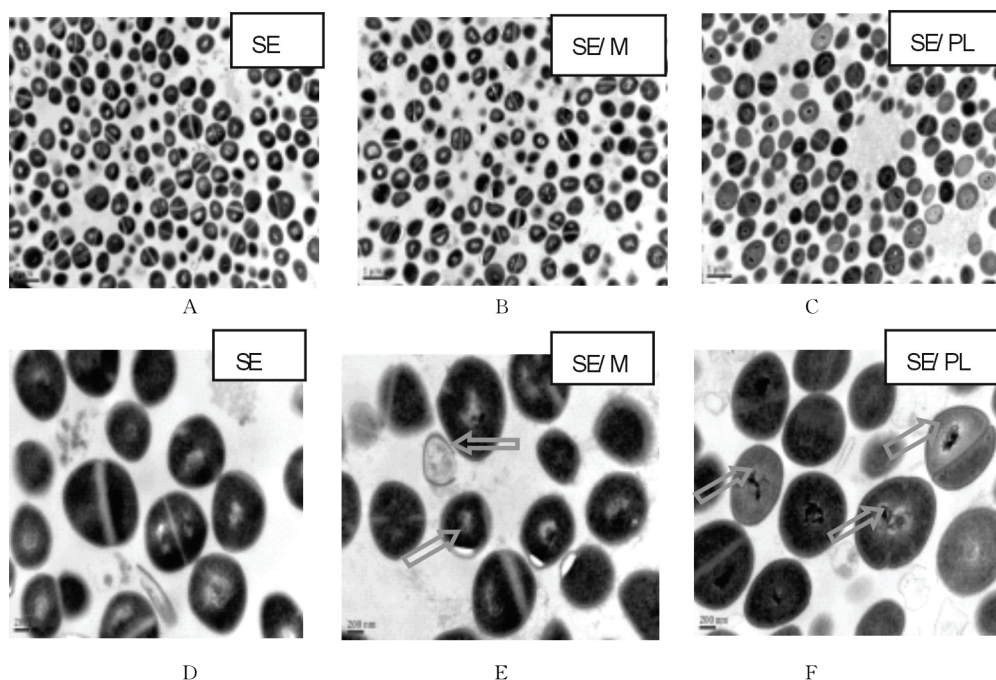
2.3 血小板对细菌显微结构的影响 取共培养12 h后 PLT 组、血浆组、BHI 培养液组的菌液离心,并固定4 h后,进行透射电镜检测,图片放大倍数分别为15k倍,30k倍,见图4。BHI 组的表皮葡萄球菌(SE)细胞结构完整,拟核区染色质结构完整清晰;血浆组(SE/M)细菌细胞壁与细胞质分离、细胞壁破裂,并且出现了细胞内容物溢出、细胞



** $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

图3 血小板对表皮葡萄球菌生长影响柱状图分析

皱缩死亡的现象;PLT 组(SE/PLT)细菌拟核区染色质结构异常、染色质发生凝集、细胞分裂减慢。结果显示:血浆成分通过破坏细菌细胞壁结构来杀死细菌,而血小板则可能通过干扰染色质结构,影响染色质功能,进而影响细菌分裂,抑制细菌的生长。



注:图A,B,C放大倍数15k倍;图D,E,F放大倍数30k倍。

图4 透射电镜观察血小板对表皮葡萄球菌亚显微结构的影响

3 讨论 表皮葡萄球菌作为一种革兰氏阳性的条件致病菌,是凝固酶阴性菌(CNS),通常寄生在人体皮肤和黏膜表面。近年来,CNS的致病性不断增强,成为医院感染的主要病原菌。调查显示,由于各种植入性器材的使用,以表皮葡萄球菌为代表的CNS引起的医院感染有日渐升高趋势,其感染率已经超过了金黄色葡萄球菌,占据革兰氏阳性菌感染的第1位,且易产生耐药性。因此,亟待研发新型有效且排异率低的抗菌物质。

血小板作为一种人体自身防御系统的成员,不仅发挥着凝血止血的功能,而且参与宿主抗感染防御过程^[18]。有研究^[19,20]表明血小板既可早期识别创伤及细菌感染信号,将该信号传递到内皮细胞、白细胞,增强白细胞对于细菌的胞内胞外免疫,又可以通过自身的胞浆颗粒分泌多种抗菌物质进行抗菌。近年来由于抗生素耐药性细菌不断增加,严重威胁公共健康安全,各种新型抗菌肽的需求也越来越迫切。本研究正是基于这一形势,对血小板抗

菌的效果及抗菌机理进行了初步研究,结果表明:血小板具有明显的抗菌效果,其抗菌的起效过程虽晚于血浆,但抗菌效果更持久,且抗菌效果更显著。因此,血小板不只具有凝血、止血的作用,还具有抗菌作用,并且可单独在体外发生直接抗菌作用。因此推测,血小板可能一方面通过自身聚集,物理包裹细菌,阻断细菌之间的相互联络,使其死亡;另一方面,血小板自身的胞浆颗粒可分泌大量的抗微生物物质,发挥抗菌作用。电镜结果进一步提示血小板处理组(SE/PLT)细菌拟核区染色质结构异常,染色质发生凝集、断裂,推测血小板很大可能是通过分泌某种物质来破坏、干扰细菌DNA的正常功能。目前已有部分科学家对血小板分泌的物质进行了大量的研究^[21~24],但由于血小板在遇到不同的细菌时,有可能产生并分泌不同的物质。因此,有必要进一步对血小板抗表皮葡萄球菌过程的分泌物进行深入研究,这对于细菌性抗感染治疗及血小板的有效利用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Zamora-Lopez MJ, Alvarez-Garcia P, Martinez-Lopez J, et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a patient with prosthetic joint[J]. Rev Esp Quimioter, 2016, 29(3): 159-160.
- [2] Stefanska J, Stepień K, Huczynski A, et al. Activity of natural polyether ionophores; monensin and salinomycin against clinical *Staphylococcus epidermidis* strains[J]. Pol J Microbiol/Pols Towar Mikrobiol, 2015, 64(3): 273-278.
- [3] Argudin MA, Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, et al. Biofilm formation of ica operon-positive *Staphylococcus epidermidis* from different sources[J]. AP-MIS, 2015, 123(12): 1081-1089.
- [4] Harris LG, Susan M, Ben P, et al. Biofilm morphotypes and population structure among *Staphylococcus epidermidis* from commensal and clinical samples[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e151240.
- [5] Conlan S, Mijares LA, Becker J, et al. *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates[J]. Genome Biol, 2012, 13(7): 212-220.
- [6] Ouyang J, Xiong L, Feng W, et al. Effects of inhibitory peptide of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on adhesion and biofilm formation of this bacterium[J]. Chinese Journal of Burns, 2015, 31(4): 285-289.
- [7] Agarwal S, Sharma G, Dang S, et al. Antimicrobial peptides as anti-infectives against *Staphylococcus epidermidis*[J]. Med Princ Pract, 2016, 25(4): 301-308.
- [8] Unosson E, Morgenstern M, Engqvist H, et al. In vitro antibacterial properties and UV induced response from *Staphylococcus epidermidis* on Ag/Ti oxide thin films[J]. J Mater Sci Mater Med, 2016, 27(3): 49.
- [9] Miyake S, Nobeyama Y, Baba-Honda H, et al. Case of ecthyma gangrenosum in which only methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* was detected[J]. J Dermatol, 2016, 43(4): 460-462.
- [10] Soroush S, Jabalameli F, Taherikalani M, et al. Investigation of biofilm formation ability, antimicrobial resistance and the *staphylococcal* cassette chromosome mec patterns of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* with different sequence types isolated from children[J]. Microb Pathog, 2016(93): 126-130.
- [11] Solomon Tsegaye T, Gnirs B K, Rahe-Meyer N, et al. Platelet activation suppresses HIV-1 infection of T cells[J]. Retrovirology, 2013(10): 48.
- [12] Johansson D, Shannon O, Rasmussen M. Platelet and neutrophil responses to Gram positive pathogens in patients with bacteremic infection[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e26928.
- [13] Burnouf T, Chou ML, Wu YW, et al. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria [J]. Transfusion, 2013, 53(1): 138-146.
- [14] Yeh JJ, Tsai S, Wu DC, et al. P-selectin-dependent platelet aggregation and apoptosis may explain the decrease in platelet count during *Helicobacter pylori* infection[J]. Blood, 2010, 115(21): 4247-4253.
- [15] 龚丽莎, 胡厚源. 融合蛋白 TAP-SSL5 对血小板和粒细胞相互作用的影响[D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
Gong LS, Hu HY. Effect of fusion protein TAP-SSL5 on platelet-leukocyte interactions [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2013.
- [16] 王晓岚. 金属离子的抗菌性能及其抗菌机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
Wang XL. Study on antibacterial activity and mechanism of metal ions[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015.
- [17] 马丽萍, 罗先明. 血小板与细菌感染[J]. 血栓与止血学, 2012, 18(6): 245-246.
Ma LP, Luo XM. Platelets and bacterial infection[J]. Chinese Journal of Thrombosis and Hemostasis, 2012, 18(6): 245-246.
- [18] Yeaman MR. Platelets in defense against bacterial pathogens[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(4): 525-544.
- [19] 虞意华, 严静. 重组人血小板生成素在脓毒性血小板减少症中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(8): 1028-1032.
Yu YH, Yan J. Effect of recombinant human thrombopoietin in the treatment of septic-related thrombocytopenia[J]. Chin J Mod Appl (下转 49 页)

- 构建及鉴定[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2004, 24(3):194-197.
- Qiao YY, Wang Y, Chen XS, et al. Construction of a large single-chain phage antibody library[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(3):194-197.
- [2] 南清振, 高蕾, 肖冰, 等. 大肠癌噬菌体抗体库的构建及初步鉴定[J]. 现代消化及介入诊疗, 2008, 13(1):1-5.
- Nan QZ, Gao L, Xiao B, et al. Construction and identification of the phage display antibody library of human colorectal cancer[J]. Modern Digestion and Interventional, 2008, 13(1):1-5.
- [3] 张建琼, 谢维, 张雪萍, 等. 人源抗丙型肝炎病毒噬菌体抗体库的构建、筛选及表达[J]. 上海免疫学杂志, 2000, 20(5):304-307.
- Zhang JQ, Xie W, Zhang XP, et al. Construction, screening and expression of hepatitis C virus specific phage antibodies combinatorial library[J]. Shanghai Journal of Immunology, 2000, 20(5):304-307.
- [4] 傅蓉, 刘刚, 戴红梅, 等. 利用 HER2/neu 胞外配体结合区 2 从噬菌体抗体库中筛选抗体及其初步鉴定[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(4):574-576.
- Fu R, Liu G, Dai HM, et al. Use of HER2/neu extracellular ligand binding area 2 from phage antibody libraries antibody screening and preliminary identification[J]. Journal of Biotechnology Communications, 2006, (4):574-576.
- [5] 葛晓冬, 刘友生, 王晓东, 等. 人源噬菌体抗体库的构建及抗人 NH-LBP 抗体的筛选与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(2):180-184.
- Ge XD, Liu YS, Wang XD, et al. Construction of human phage antibody library and screening and characterization of phage antibodies against N-terminal fragment of human lipopolysaccharide binding protein[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2005, 21(2):180-184.
- [6] Meulemans EV, Slobbe R, Wastervall P, et al. Selection of phage displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody[J]. J Mol Biol, 1994, 244(4):353-360.
- [7] Moran MJ, Andris JS, Matsumoto Y, et al. Variable region genes of anti-HIV human monoclonal antibodies: Non-restricted use of the V gene repertoire and extensive somatic mutation[J]. Molecular Immunology, 1993, 30(16):1543-1551.
- [8] He F, Nie Y, Han Z, et al. Production of phage-displayed anti-idiotypic antibody single chain variable fragments to MG7 monoclonal antibody directed against gastric carcinoma[J]. J Chin Med Sci, 2001, 81(1):33-36.
- [9] 钟彦伟, 成军, 王刚, 等. 乙肝病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(2):153-154.
- Zhong YW, Cheng J, Wang G, et al. Screening on human phage gantibody of hepatitis B virus core antigen[J]. China Public Health, 2002, 18(2):153-154.
- [10] 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 的研究进展[J]. 国外医学病毒学分册, 2000, 7(1):14-17.
- Cheng J, Chen JM. The research progress of hepatitis C virus(HCV) non structural protein NS4A[J]. Foreign Medical Toxicology Pathol, 2000, 7(1):14-17.
- [11] 马巍娜, 刘雪林, 宋宏彬, 等. 抗甲硝唑人源 scFv 抗体筛选与鉴定[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(4):7-10.
- Ma WN, Liu XL, Song HB, et al. Screening and characterization of human phage antibody to metronidazole[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(4):7-10.
- [12] 马巍娜, 刘雪林, 宋宏彬, 等. 三聚氰胺人源 scFv 抗体筛选与鉴定[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3):10-13.
- Ma WN, Liu XL, Song HB, et al. Screening and characterization of human phage antibody to melamine[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3):10-13.
- [13] 刘美红, 贺海平. 噬菌体肽库在宫颈癌血清肿瘤标志物筛选中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(7):908-910.
- Liu MH, He HP. Application of phage display peptide library in screening of the tumor markers in the serum of cervical cancer[J]. J Mod Oncolo, 2015, 23(7):908-910.
- (上接 45 页)
- Pharm, 2015, 32(8):1028-1032.
- [20] Kulikov SN, Khairullin RZ, Varlamov VP. Influence of polycations on antibacterial activity of lysostaphin[J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2015, 51(6):610-615.
- [21] Thangamani S, Mohammad H, Abushahba MF, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens[J]. Sci Rep, 2016(6):22571.
- [22] Askoxylakis V, Marr A, Altmann A, et al. Peptide-based targeting of the platelet-derived growth factor receptor beta[J]. Mol Imaging Biol, 2013, 15(2):212-221.
- [23] Forsman H, Onnheim K, Andreasson E, et al. Reactivation of desensitized formyl peptide receptors by platelet activating factor: a novel receptor cross talk mechanism regulating neutrophil superoxide anion production[J]. PLoS One, 2013, 8(3):e60169.
- [24] Xiao S, Charonko JJ, Fu X, et al. Structure, sulfatide binding properties, and inhibition of platelet aggregation by a disabled-2 protein-derived peptide[J]. J Biol Chem, 2012, 287(45):37691-37702.

收稿日期:2016-01-09

修回日期:2016-01-29

收稿日期:2016-05-04

修回日期:2016-07-04