【引文格式】谈桂其,钟静,翁智胜,等. Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光对表皮葡萄球菌活性及结构的影响[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2020,27(1):10 - 13. DOI:10.3969/j. issn. 1674 - 8468. 2020. 01. 003.

· 论著 ·

Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光对表皮葡萄球菌活性及结构的影响

谈桂其, 钟静, 翁智胜, 彭洁雯, 李晓辉, 廖梦怡, 易江华, 辛甜甜

(广州医科大学附属第三医院皮肤科, 广东 广州 510150)

[摘要] **目的:**探讨不同能量密度的 Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光对表皮葡萄球菌的菌体活性及结构的影响。**方法:** 临床获取毛囊炎标本,用胰蛋白胨大豆肉汤琼脂平板(TSA)培养获取菌落,基因测序进行鉴定,确定表皮葡萄球菌后进行培养,使用 Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光对菌体进行照射。实验组:激光光斑直径 2 mm,脉宽≤8 ns,根据不同能量密度 15.9、19.1、22.2、25.4、28.7 J/cm^2 分设 5 组;对照组不予激光照射。以菌落计数法评估菌体活性,并利用透射电镜观察菌体结构的改变。激光能量与菌落数的相关性采用 Pearson 相关分析。**结果:**实验组菌落计数分别为(234 500 ± 12 554)、(89 200 ± 10 485)、(52 200 ± 6 214)、(26 200 ± 4 157)、(8 300 ± 2 213) CFU/mL,对照组菌落数为(276 400 ± 13 150) CFU/mL,各组间差异有统计学意义(F = 1 536.97, P < 0.05)。激光能量与菌落数呈负相关(r = - 0.90, P < 0.05)。能量密度在 19.1 J/cm^2 以上时,对菌体结构有破坏作用,能量越大,破坏程度越大。**结论:** Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光对表皮葡萄球菌有抑菌和结构破坏作用。

[关键词] Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光; 表皮葡萄球菌; 菌体活性

[中图分类号] R378.1$^+$1 [文献标识码] A DOI:10.3969/j. issn. 1674 - 8468. 2020. 01. 003

Effects of Q-switch Nd:YAG 1 064 nm laser on the activity and structure of staphylococcus epidermidis

TAN Gui-qi, ZHONG Jing, WENG Zhi-sheng, PENG Jie-wen, LI Xiao-hui, LIAO Meng-yi, YI Jiang-hua, XIN Tian-tian

(*Dermatology Department, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou* 510150, *China*)

*Corresponding author: WENG Zhi-sheng, E-mail:wzs*338@21*cn. com*

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effects of Q-switch Nd:YAG 1 064 nm laser at different energy levels on the activity and structure of staphylococcus epidermidis. **Methods:** Colonies of folliculitis were collected from patients, and cultured with TSA. Identification of staphylococcus epidermidis was made by gene sequencing. The staphylococcus epidermidis was cultured and irradiated by Q-switch Nd:YAG 1 064 nm laser. In the experimental group, staphylococcus epidermidis was irradiated with laser at a spot size of 2 mm diameter, pulse width ≤8 ns, and various energy levels (15.9, 19.1, 22.2, 25.4, 28.7 J/cm^2), while staphylococcus epidermidis without laser treatment served as the control. The survivability and structure of staphylococcus epidermidis

通信作者:翁智胜,E-mail:wzs338@21cn. com

were evaluated by counting colony-forming unit and transmission electron microscopy, respectively. The pearson correlation analysis was used to determine the correlation of laser energy and number of colony. **Results**: Following irradiation with laser at energy levels of 15.9, 19.1, 22.2, 25.4, 28.7 J/cm^2, colony counts were 234 500 ± 12 554, 89 200 ± 10 485, 52 200 ± 6 214, 26 200 ± 4 157, 8 300 ± 213 CFU/mL, respectively, which were significantly lower than the control (276 400 ± 13 150 CFU/mL) (F = 1 536.97, P < 0.05). Colony counts negatively correlated with laser energy levels (r = −0.90, P < 0.05). In addition, laser induced a dose-dependent disruption of bacterial structure, starting at energy levels above 19.1 J /cm^2. **Conclusions**: Q-switch Nd:YAG 1 064 nm laser can destroy the structure of staphylococcus epidermidis, and inhibit their activity.

[**Keywords**] Q-switch Nd: YAG laser; staphylococcus epidermidis; bacteria activity

表皮葡萄球菌是毛囊炎常见的致病菌之一,严重时可影响毛囊周围及皮下组织形成疖、痈[1]。毛囊炎病变部位主要位于真皮层,传统治疗方法为外用或口服抗生素,难免存在药物不良反应及细菌耐药的问题。Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光具有选择性光热作用、光机械作用、光生物学作用等[2],激光穿透达 3.7 mm[3],深达毛囊部位,通过光热作用使病变组织中表皮葡萄球菌受损,从而抑制其生长。因此,本研究探索不同能量密度对表皮葡萄球菌活性及结构的影响,为临床开展毛囊炎激光治疗提供依据。

1 对象与方法

1.1 标本来源及培养基

表皮葡萄球菌病原体来源于我院皮肤科门诊毛囊炎患者,临床表现典型,结合病原学检查,诊断符合《皮肤性病学》细菌性毛囊炎诊断标准[4]。

培养基:胰蛋白胨大豆肉汤琼脂平板(TSA),Leeming-Notman 培养基。

1.2 主要仪器

Q 开关掺钕钇铝石榴石激光治疗仪(长春佳技光电科技有限公司,型号 JJ-10A),透射电子显微镜(HITACHI,型号:HT7700)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株鉴定 选取毛囊炎患者脓疱,75% 酒精消毒表面,用无菌针头挑破脓疱,用力挤出脓液并挑取至 TSA、Leeming-Notman 培养基,用无菌接种环划线接种,放置 37 ℃恒温培养箱中培养 1 周。仅见 TSA 培养基上菌落长出,取单一菌落进行基因测序鉴定。

1.3.2 实验分组及操作 选择二次传代菌体,挑取单一菌落于玻片上,予 10 μL 无菌生理盐水稀释,均匀涂平,待自然干燥,分为实验组与对照组。实验组:激光光斑直径 2 mm,脉宽≤8 ns,以 500、600、700、800、900 mJ(即能量密度为 15.9、19.1、22.2、25.4、28.7 J/cm^2)照射菌体,分别为 A、B、C、D、E 组;对照组不予激光照射。实验组与对照组共 6 组,各组均 10 个标本。

1.3.3 菌体活性测定 集落形成试验[5]:激光照射后将每组菌体用无菌生理盐水洗脱并收集于 EP 管中,摇匀制成菌悬液,采用血细胞计数板计算每组菌悬液浓度,调整至相同浓度后划线接种于 TSA,37 ℃恒温箱培养 7 天,每日观察、计算菌落数,比较各组间菌落数。

1.3.4 透射电镜观察 将每组菌体用无菌生理盐水洗脱并收集于 EP 管中,离心去上清液,加入固定液,再经后固定、脱水、渗透、包埋、切片、染色,最后透射电镜下观察,采集图像分析。

1.4 统计学处理

利用 SPSS 26.0 统计软件分析数据。各组菌落数以均数 ± 标准差表示。多组间菌落数比较采用单因素方差分析;对照组与各实验组菌落数比较采用 t 检验;实验组激光能量与菌落数的关系采用 Pearson 相关分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株鉴定

经 16SrRNA 基因扩增,测序结果与 BLAST 比对显示表皮葡萄球菌株(GenBank No. NR_113957.1)100%。

2.2 菌体活性

集落形成试验:培养 7 天后各组培养基上均可见菌落,对照组菌落数最多,实验组菌落数明显减少。各组菌落数详见表 1。经统计比较,6 组菌落数差异有统计学意义($F = 1\ 536.97$, $P < 0.05$);对照组与实验 A、B、C、D、E 组比较,差异均有统计学意义(t 值分别为 7.28、35.20、48.74、57.37、63.58,P 值均 < 0.05)。激光能量与菌落数呈高度负相关($r = -0.90$, $P < 0.05$)。

2.3 透射电镜观察

实验组和对照组均可见细胞壁表面分布大量絮状物(多糖、脂类及蛋白),细胞膜皱缩、破裂,质壁分离,原生质浓缩,细胞器结构模糊。对照组细胞壁完整,厚度不均匀,平均厚度 64 nm。实验组中:A 组细胞壁局部明显增生,平均厚度 183 nm;B 组细胞壁局部明显增生,平均厚度 115 nm,细胞膜大面积消失;C 组细胞壁平均厚度 70 nm,细胞膜小面积溶解,胞内可见高电子密度颗粒聚集,细胞基质溶解;D 组细胞壁结构模糊,平均厚度 69 nm,细胞膜小面积溶解,胞内可见高电子密度颗粒聚集,细胞基质溶解;E 组细胞壁结构模糊,平均厚度 92 nm,细胞膜大面积溶解,胞内可见高电子密度颗粒聚集,细胞基质溶解。详见图 1、图 2A ~ 2E。

表 1 不同能量激光照射后各组菌落数对比 (CFU/mL, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of bacterial colonies in each group after laser irradiation at different energies (CFU/mL, $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
菌落数	276 400 ± 13 150	234 500 ± 12 554	89 200 ± 10 485	52 200 ± 6 214	26 200 ± 4 157	8 300 ± 2 213

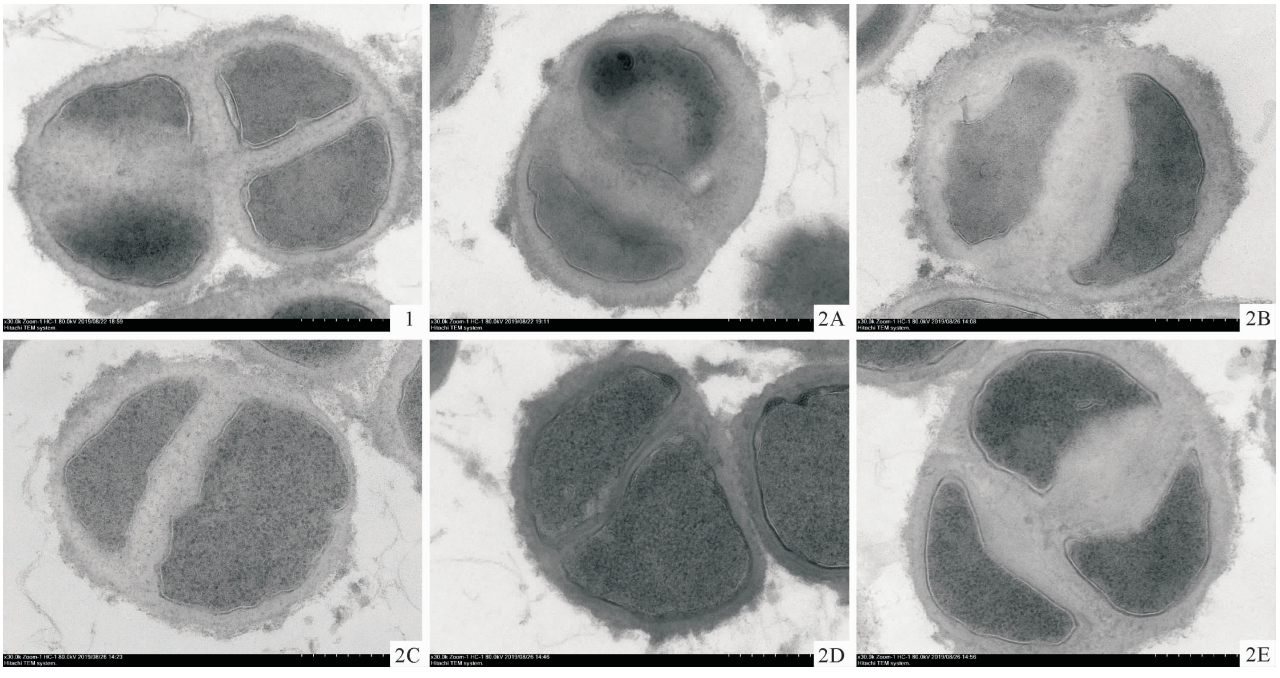


图 1 对照组:细胞壁完整;细胞膜皱缩;细胞基质无异常 图 2 实验组 2A:细胞壁粗糙;细胞膜皱缩;细胞基质无异常;2B:细胞壁粗糙;大面积细胞膜消失;细胞基质无异常;2C:细胞壁粗糙,结构模糊;小面积细胞膜溶解;细胞基质溶解;2D:细胞壁粗糙,结构模糊;小面积细胞膜溶解;细胞基质溶解;2E:细胞壁粗糙,结构模糊;大面积细胞膜溶解;细胞基质溶解

Fig. 1 Control group: the cell wall was complete. The cell membrane was wrinkled. The cell matrix was normal. Fig. 2 Treatment group. 2A: The cell wall was rough. The cell membrane was wrinkled. The cell matrix was normal; 2B: The cell wall was rough. A large area of cell membrane disappeared. The cell matrix was normal; 2C: The cell wall was rough with fuzzy structure. A small area of cell membrane was dissolved. The cell matrix was dissolved; 2D: The cell wall was rough with fuzzy structure. A small area of cell membrane was dissolved. The cell matrix was dissolved; 2E: The cell wall was rough with fuzzy structure. A large area of cell membrane was dissolved. The cell matrix was dissolved.

3 讨论

表皮葡萄球菌是临床上最常见的凝固酶阴性的葡萄球菌,是一种条件致病菌,一般粘附于人体的皮肤和粘膜,是毛囊炎致病菌之一[1]。本研究的表皮葡萄球菌来源于临床符合毛囊炎表现患者,马拉色菌培养基阴性,并经基因测序证实。表皮葡萄球菌性毛囊炎临床上主要外用或口服抗生素治疗,但随着临床抗生素的广泛使用、甚至滥用,其耐药现象日益严重,给治疗带来困难[6-7]。

Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光在调 Q 模式下脉宽为纳秒级,1 064 nm 波长能深达 3.7 mm,可被黑色素、血红蛋白、水吸收,对周围组织热损伤少,目前主要用于真皮色素增加性皮肤病的治疗。表皮葡萄球菌感染毛囊部位在毛囊口及深部,Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光可达此深度,并利用其选择性光热、光机械、光生物学作用影响菌体,因此,本研究使用 Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光对表皮葡萄球菌进行照射,培养后进行菌落计数评估活性,并通过透射电镜观察其结构变化,以探讨其对表皮葡萄球菌的影响。结果显示:实验 A 组与对照组相比,细胞结构无明显变化,但菌落计数差异有统计学意义($P<0.05$);而 B、C、D、E 组与对照组比较,细胞结构上有较大变化,细胞膜均出现受损,其中 C、D、E 组细胞基质出现溶解,E 组结构破坏最严重;B、C、D、E 组菌落计数均较对照组明显减少,且激光能量密度与菌落数呈高度负相关($r=-0.90$,$P<0.05$)。国外有体外研究发现 Nd:YAG 1 064 nm 激光对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌和变形链球菌的生长有抑制作用,用较大功率对放线菌也有抑制作用[8-10]。但其脉宽较长(为毫秒级),对皮肤组织容易造成非选择性损伤,而 Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光为纳秒级脉宽,对靶点周围组织热损伤小,安全性更高[2]。

本研究结果提示,Q 开关 Nd:YAG 1 064 nm 激光对表皮葡萄球菌活性有抑制作用,随着能量密度的增加,结构破坏越严重。研究结果为其应用于表皮葡萄球菌性毛囊炎的治疗提供了理论依据,但本实验仅对表皮葡萄球菌进行了菌体活性、超微结构的初步实验,而对于菌体的致病力、致病机制及其他菌种是否有相同效果还有待进一步探究。

[参考文献]

[1] 蒙在杨, 秦耀春. 皮肤毛囊炎患者病原菌分离鉴定结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(4):445-446.

[2] TSEN S D, KIBLER K, JACOBS B, et al. Selective photonic disinfection of cell culture using a visible ultrashort pulsed laser[J]. LEEE J Sel Top Quantum Electron, 2016, 22(3):pii:7100508.

[3] 项蕾红,周展超. 皮肤美容激光治疗原理与技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014:160.

[4] 张学军,郑捷. 皮肤性病学[M]. 9 版. 北京:人民卫生出版社, 2018:77.

[5] KWOLEK-MIREK M, ZADRAG-TECZA R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells[J]. FEMS Yeast Res, 2014, 14(7):1068-1079.

[6] 周丽萍, 郭明秋, 郑旭, 等. 不同标本来源的表皮葡萄球菌的耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(10):1178-1180.

[7] ELADLI M G, ALHARBI N S, KHALED J M, et al. Antibiotic-resistant Staphylococcus epidermidis isolated from patients and healthy students comparing with antibiotic-resistant bacteria isolated from pasteurized milk[J]. Saudi J Biol Sci, 2019, 26(6):1285-1290.

[8] EBID A A, ALHAMMAD R M, ALHENDI R T, et al. Immediate effect of pulsed high-intensity neodymium-doped yttrium aluminum garnet (Nd:YAG) laser on staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa growth: an experimental study[J]. J Phys Ther Sci, 2019, 31(11):925-930.

[9] GRZECH-LESNIAK K, NOWICKA J, PAJACZKOWSKA M, et al. Effects of Nd:YAG laser irradiation on the growth of Candida albicans and Streptococcus mutans: in vitro study[J]. Lasers Med Sci, 2019, 34(1):129-137.

[10] VESCOVI P, CONTI S, MERIGO E, et al. In vitro bactericidal effect of Nd:YAG laser on Actinomyces israelii [J]. Lasers Med Sci, 2013, 28(4):1131-1135.

[收稿日期] 2019-11-22
[修回日期] 2020-02-03