

血小板裂解物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜的抑制作用及对PIA合成的影响

谷雯竹*, 梁 静#

新疆医科大学第六附属医院输血科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2026年2月1日; 录用日期: 2026年2月25日; 发布日期: 2026年3月4日

摘要

目的: 探究血小板裂解物(Platelet Lysate, PL)对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)生物膜形成的影响及其作用机制。方法: 采用微量肉汤稀释法测定PL对MRSA浮游菌的最小抑菌浓度(MIC); 通过结晶紫染色评估PL对生物膜形成及成熟生物膜的干预作用; 利用刚果红平板法检测PL对多糖胞间黏附素(PIA)生成的影响; 通过扫描电镜观察MRSA生物膜的结构变化。结果: PL在实验浓度范围内未显示对浮游菌的MIC。结晶紫染色表明, PL可浓度依赖性地显著抑制MRSA生物膜形成($P < 0.05$), 但对成熟生物膜无显著影响。刚果红实验显示PL不抑制PIA生成。扫描电镜观察证实PL能破坏生物膜的三维结构, 使其变得稀疏、不连续。结论: PL在非杀菌浓度下可有效抑制MRSA生物膜形成并破坏其结构, 且该作用可能不依赖于PIA合成通路, 提示PL可能通过干扰细菌初始黏附等非经典途径发挥抗生物膜效应, 为基于血小板来源制剂的抗生物膜策略提供了实验依据。

关键词

血小板裂解物, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 生物膜, 抗菌, PIA

Inhibitory Effect of Platelet Lysate on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm and Its Impact on PIA Synthesis

Wenzhu Gu*, Jing Liang#

Department of Transfusion of The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

Received: February 1, 2026; accepted: February 25, 2026; published: March 4, 2026

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 谷雯竹, 梁静. 血小板裂解物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜的抑制作用及对 PIA 合成的影响[J]. 临床医学进展, 2026, 16(3): 656-662. DOI: 10.12677/acm.2026.163833

Abstract

Objective: To investigate the effect of platelet lysate (Platelet Lysate, PL) on the formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) biofilms and its underlying mechanism. **Methods:** The minimum inhibitory concentration (MIC) of PL against MRSA planktonic bacteria was determined using the microdilution broth method. The inhibitory effect of PL on biofilm formation and mature biofilms was evaluated by crystal violet staining. The Congo red plate assay was used to assess the impact of PL on polysaccharide intercellular adhesion (PIA) production. Structural changes in MRSA biofilms were observed by scanning electron microscopy. **Results:** PL did not exhibit a MIC against planktonic bacteria within the experimental concentration range. Crystal violet staining indicated that PL significantly inhibited MRSA biofilm formation in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$), but had no significant effect on mature biofilms. The Congo red assay showed that PL did not inhibit PIA production. Scanning electron microscopy confirmed that PL disrupted the three-dimensional architecture of biofilms, rendering them sparse and discontinuous. **Conclusion:** At non-bactericidal concentrations, PL effectively inhibits MRSA biofilm formation and disrupts biofilm structure. This effect may not be dependent on the PIA synthesis pathway, suggesting that PL may exert its anti-biofilm effects through non-classical pathways, such as interfering with initial bacterial adhesion. This study provides experimental evidence for platelet-derived products as a potential anti-biofilm strategy.

Keywords

Platelet Lysate, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Antibacterial, PIA

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

金黄色葡萄球菌是临床常见革兰氏阳性致病菌,在感染病例中频繁检出。随抗生素广泛应用及滥用,其耐药性日趋严峻,其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的流行给全球公共卫生带来巨大挑战[1]。数据显示,MRSA 在金葡萄分离株中检出率达 34.15%,对 β -内酰胺类抗生素普遍耐药,对万古霉素敏感性亦下降,导致治疗难、病死率高,治疗方案受限[2]。MRSA 还易形成生物膜,阻碍抗生素渗透并逃逸免疫清除,加剧感染难治性。其生物膜形成机制复杂,含 *ica* 操纵子调控 PIA 合成及非 PIA 依赖通路[3]。因此,探索阻断生物膜形成且不易诱导耐药的新策略,是当前抗 MRSA 研究的重要课题。

血小板裂解物来源于血小板,富含多种生长因子与具有抗菌活性的蛋白质成分,近年来在组织工程与再生领域表现出良好的应用前景。已有研究报道其对 MRSA 生长具有一定抑制效果,并与庆大霉素存在协同作用[4]。血小板是天然免疫的重要组成部分,参与机体的各项免疫应答。最新研究表明,源自富血小板血浆(PRP)的活性成分在体内外实验中均显示出对金黄色葡萄球菌生物膜的清除作用[5]。然而,关于血小板裂解物能否干预 MRSA 生物膜的形成,特别是其作用是否与 PIA 依赖性途径相关,目前尚未有系统性的研究报道。

综上,本研究合理提出假设:血小板裂解物可能通过影响 MRSA 的初始黏附阶段抑制生物膜的形成。为此,本研究系统评价血小板裂解物对生物膜形成的抑制作用,初步分析其作用机制是否与 PIA 通路相关,旨在为今后开发基于血小板活性成分的抗生物膜治疗方法提供理论与实验依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料、试剂与仪器

实验菌种均由新疆医科大学第六附属医院检验科提供, 且耐药性经临床抗菌耐药性的验证。

MHB 肉汤、TSB 肉汤、BHI 肉汤。结晶紫、刚果红。恒温培养摇床、多功能酶标仪、超净工作台、全自动血细胞计数仪、低速冷冻离心机。

2.2. 实验方法

2.2.1. 富含血小板血浆及血小板裂解物的制备

使用含 ACD-A 抗凝剂的采血管采集 6 位适龄健康志愿者的静脉血, 经两次差速离心获得浓缩 PRP。使用血细胞计数仪计数, 将血小板浓度统一校准为 $1500 \times 10^3/\mu\text{L}$, 并以此定义为本实验中的“1X”浓度, 与 PBS 溶液按不同比例混合得不同浓度的 PRP。将 PRP 分装后, 于 -80°C 和 37°C 下反复冻融 6 次以充分裂解血小板。裂解液经高速离心、过滤除菌后即得 PL。

2.2.2. 最小抑菌浓度测定

采用临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的肉汤微量稀释法[6], 在 96 孔板中用 MHB 对 PL 进行 2 倍系列稀释(起始浓度为“4X”), 将 MRSA 菌液浓度调整至 0.5 麦氏浊度后加入 96 孔板, 使其终浓度约为 5×10^5 CFU/mL。置于 37°C 条件下培养 18 至 24 小时后, 以肉眼观察未见明显细菌生长时所对应的最低药物浓度判定为最低抑菌浓度(MIC)。实验独立重复 3 次。

2.2.3. 结晶紫染色测定生物膜含量

生物膜形成抑制实验: 在 96 孔板中, 将 MRSA 菌液($\text{OD}_{600} = 0.1$, TSB + 1%葡萄糖配制)与实验浓度的 PL 同时加入, 37°C 静置培养 24 小时。

成熟生物膜干预实验: 先接种 MRSA 菌液培养 24 小时形成成熟生物膜, 弃上清并轻柔洗涤后加入含不同实验浓度的 PL 继续培养 24 小时。

培养结束后, 孔板经 PBS 洗涤、甲醇固定、0.1%结晶紫染色, 用 33%冰醋酸溶解染料后, 测量酶标仪 590 nm 时的吸光度值。实验独立重复 3 次。

2.2.4. 刚果红平板法测定 PIA

将过夜培养的 MRSA 菌液与等体积得 1X、2X 浓度的 PL 混合, 室温孵育 30 分钟。对照组用 PBS 处理。取 $2 \mu\text{L}$ 混合液点种子含 0.08%刚果红和 1%葡萄糖的 BHI 琼脂平板上, 37°C 培养 72 小时后, 观察并记录菌落颜色与形态。

2.2.5. 扫描电子显微镜观察

在无菌 24 孔板中放入经多聚赖氨酸预处理的玻片, 加入 MRSA 菌液(制备方法同 2.2.3)培养 24 小时以充分形成生物膜。实验分为 PBS 处理对照组、“1X”浓度 PL 处理组和“2X”浓度 PL 处理组。处理 24 小时后, 取出玻片, 用 0.1 MPBS (pH 7.4)轻柔漂洗 3 次以去除浮游菌。在 4°C 使用 2.5%戊二醛溶液固定, 乙醇梯度脱水 15 分钟。经临界点干燥、喷金处理后, 使用扫描电子显微镜在加速电压 5.0 kV 下观察并拍摄生物膜表面形貌。

2.3. 统计分析

所有实验数据以均值 \pm 标准差表示。采用 GraphPadPrism9.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较使用 Tukey's 多重比较检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

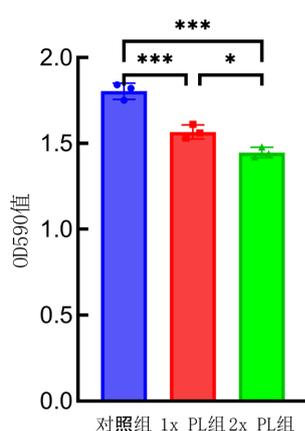
3. 结果

3.1. PL 对 MRSA 浮游菌的抗菌活性

采用肉汤微量稀释法测定血小板裂解物(PL)对 MRSA 浮游菌的最小抑菌浓度(MIC)。在实验设定的浓度范围(“1X”至“4X”)内,与细菌生长对照组相比,各浓度 PL 处理组在培养终点均未观察到肉眼可见的浊度差异,因此未检测到明确的 MIC 值。

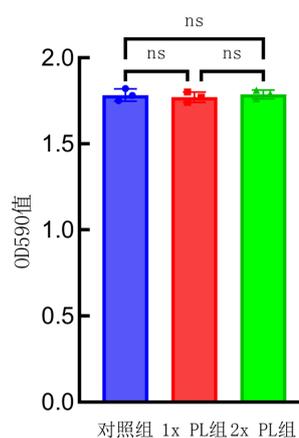
3.2. PL 对 MRSA 生物膜形成的影响

采用结晶紫染色法定量评估不同浓度血小板裂解物对 MRSA 生物膜形成的影响,结果如图 1 所示。经 24 小时共培养后,各处理组的生物膜生物量与对照组相比均有不同程度下降,且具有统计学意义($P < 0.05$)。1XPL 组的生物膜形成抑制率为 13.09%, 2XPL 组的抑制率为 19.74%。



(a) PL对MRSA生物膜形成的影响

(a) Effect of PL on MRSA biofilm formation



(b) PL对成熟MRSA生物膜的影响

(b) Effect of PL on mature MRSA biofilms

Figure 1. Effect of PL on MRSA biofilm

图 1. PL 对 MRSA 生物膜的影响

3.3. PL 对成熟 MRSA 生物膜的影响

为探究 PL 对成熟生物膜的作用,我们对成熟(48 小时)生物膜进行 PL 干预。结晶紫染色结果显示(图 2),不同浓度的 PL 处理组 24 小时后的 OD₅₉₀ 值与 PBS 对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。

3.4. PL 对 PIA 生成的影响

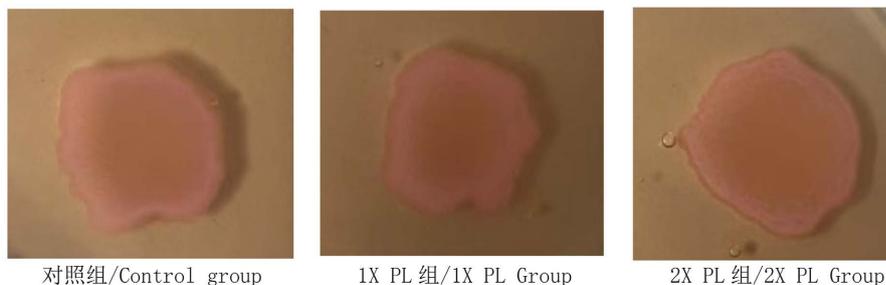


Figure 2. Results of Congo red agar assay

图 2. 刚果红实验结果

PBS 对照组 MRSA 菌落呈现黑色、干燥、表面粗糙的形态。经 1X PL 与 2X PL 预处理的实验组, 其菌落同样呈现黑色、干燥且表面粗糙的表型。在菌落颜色深度、干燥程度及表面形态方面, 各 PL 处理组与对照组之间未见明显差异。

3.5. PL 对 MRSA 生物膜微观结构的影响

如图 3 所示, 与 PBS 处理的对照组相比, 经血小板裂解物处理 24 小时的 MRSA 生物膜, 其微观结构发生明显改变。对照组生物膜结构致密, 细菌被大量胞外基质包裹并紧密粘连, 形成连续的三维网状结构。PL 处理组生物膜结构则变得稀疏且不连续。视野中细菌多以游离状态或小团簇形式存在, 细菌间的胞外基质连接显著减少, 完整的网状结构被破坏。

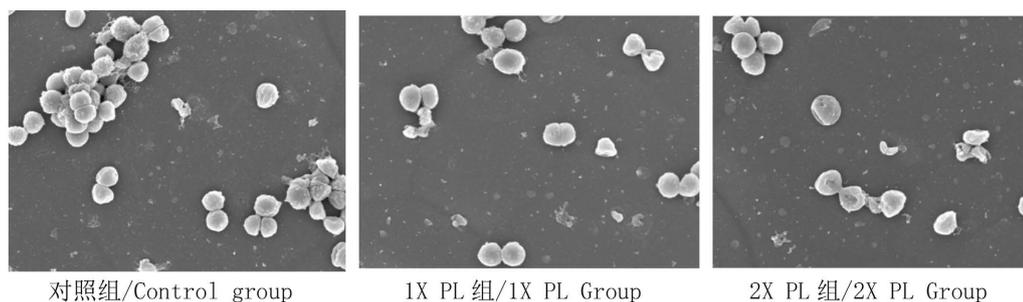


Figure 3. Comparative SEM images
图 3. 扫描电镜对比图

4. 讨论

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌所致的临床感染目前仍是临床治疗中的棘手问题。该菌株耐药性强, 感染后易复发, 给临床带来了诸多挑战。生物膜是细菌形成的结构性保护屏障, 可帮助其躲避宿主免疫清除、抵抗抗菌药物作用, 其形成由多种调控机制共同参与, 并非单一途径介导。近年来针对生物膜形成早期的干预手段, 尤其是“抗毒力”策略, 因不直接产生杀菌效应同时能降低耐药诱导风险, 已成为抗感染领域的研究重点。本研究来源于血小板的血小板裂解物为研究对象系统评估了亚抑菌浓度下对 MRSA 生物膜的干预效果。已有研究证实[7], 血小板及其裂解物对 MRSA 等多种病原体具有显著体外抗菌活性为本次实验奠定了重要理论基础。实验发现 PL 无直接杀灭 MRSA 的作用, 但能有效抑制其生物膜早期形成、破坏已形成的膜结构, 且该作用不依赖经典 PIA 合成通路, 提示其可能通过靶向生物膜形成初始环节发挥抗生物膜功效, 为开发基于血液成分的新型抗感染方案提供了新的实验依据与理论参考。

本研究通过结晶紫染色实验证实, PL 以浓度依赖的方式显著抑制 MRSA 生物膜。但 PL 对已成熟的生物膜影响甚微, 这一结果暗示其作用靶点可能位于生物膜建立的初始阶段, 即细菌的表面黏附与早期微菌落形成期。此推测在扫描电镜观察中得到印证: PL 处理使原本致密、连续的生物膜结构变得稀疏、破碎, 细菌多以分散或小团簇形式存在, 胞外基质网络显著减少。这种形态学改变与典型的生物膜抑制剂作用特征相符, 进一步支持 PL 主要干扰了生物膜的黏附组装过程, 而非降解已形成的成熟生物膜。也有研究发现富血小板血浆可有效抑制铜绿假单胞菌和大肠杆菌的生物膜形成[8], 这展现了血小板相关制剂对生物膜的抑制作用的极大前景。

为探究相关机制, 本研究评估了 PL 对 PIA 合成的影响。刚果红实验显示, PL 处理组并未影响 PIA 的生成, 表明其抗生物膜效应不依赖于由 *ica* 操纵子介导的 PIA 依赖性通路。这与其他天然化合物如大黄素(通过下调 *ica* 操纵子)或巴西苏木素(通过抑制转录调控因子 SarA 以影响 *ica* 表达)的作用机制形成鲜明对比。本研究的发现将 PL 抑制 MRSA 生物膜的机制探究方向引向了 PIA 非依赖性的黏附途径。研究

证实由血小板来源的特定抗菌蛋白血小板杀菌蛋白(tPMP-1)的作用机制为靶向细菌细胞质膜[9], 因此, 血小板及其衍生物的抑菌活性的发挥较为复杂, 这也为 PL 可能通过非 PIA 依赖途径发挥作用提供了视角。除直接竞争黏附位点外, PL 亦可能通过影响其他调控通路间接干扰生物膜形成。MRSA 生物膜的建立还受到群体感应系统(如 Agr 系统)、全局调控因子(如 SarA)以及细菌代谢状态的精密调控。并且有研究发现血小板裂解物中的关键成分血小板因子 4 不仅能直接结合细菌、促进清除, 还显示出抗生物膜活性[10][11]。PL 中富含的血小板源性因子是否可能模拟宿主信号, 干扰上述细菌细胞间的通讯或基因表达程序也是一个值得探究的方向。然而, 本研究观察到的 PL 对成熟生物膜无效的现象, 一定程度上降低了其通过影响群体感应(常在生物膜发育后期发挥作用)或强力降解基质的可能性。因此, 干扰初始黏附仍是最能统一解释本研究全部发现的核心机制。

综上, 本研究首次揭示了血小板裂解物在非杀菌浓度下以一种不依赖经典 PIA 通路的方式有效干预 MRSA 生物膜的形成。PL 中具体的效应分子有待进一步纯化与鉴定, 未来的研究可从分离 PL 中关键的活性因子出发, 并将其作用机制与已知的黏附素通路进行相关性检验。此外, 将血小板膜作为功能性载体或中和剂以靶向清除细菌及其毒素的新兴研究[12], 也为基于 PL 成分的抗生物膜策略设计提供了新视角。这一工作方向有望将本研究发现的表型现象转化为一种具有明确靶点和机制的抗生物膜新策略。

基金项目

基金名称: 血小板裂解物靶向 SarA 抑制 ica 依赖性 PIA 干预 MRSA 生物膜形成的研究; 基金等级: 自治区级。自治区研究生科研创新项目(编号: XJ2025G155)。

参考文献

- [1] Nandhini, P., Kumar, P., Mickymaray, S., Alothaim, A.S., Somasundaram, J. and Rajan, M. (2022) Recent Developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Treatment: A Review. *Antibiotics*, **11**, Article 606. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050606>
- [2] Nielsen, K.T., Petersen, B.I., Xu, L., *et al.* (2024) The SPX Stress Regulator Confers High-Level β -Lactam Resistance and Decreases Susceptibility to Last-Line Antibiotics in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **68**, e0033524.
- [3] Alabdullatif, M. and Alzahrani, A. (2022) Expression of Biofilm-Associated Genes in *Staphylococcus aureus* during Storage of Platelet Concentrates. *Transfusion and Apheresis Science*, **61**, Article 103456. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2022.103456>
- [4] Różalski, M.I., Micota, B., Sadowska, B., Paszkiewicz, M., Więckowska-Szakiel, M. and Różalska, B. (2013) Antimicrobial/Anti-Biofilm Activity of Expired Blood Platelets and Their Released Products. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, **67**, 321-325.
- [5] Gilbertie, J.M., Schaer, T.P., Engiles, J.B., Seiler, G.S., Deddens, B.L., Schubert, A.G., *et al.* (2022) A Platelet-Rich Plasma-Derived Biologic Clears *Staphylococcus aureus* Biofilms While Mitigating Cartilage Degeneration and Joint Inflammation in a Clinically Relevant Large Animal Infectious Arthritis Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **12**, Article ID: 895022.
- [6] Schuetz, A.N., Ferrell, A., Hindler, J.A., Humphries, R. and Bobenchik, A.M. (2025) Overview of Changes in the Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: M100 32nd and 33rd Editions. *Journal of Clinical Microbiology*, **63**, e0162323. <https://doi.org/10.1128/jcm.01623-23>
- [7] 刘二雄, 王文婷, 徐金梅, 等. 血小板对 5 种常见致病菌抗菌效果的比较分析[J]. 中国输血杂志, 2025, 38(6): 747-758.
- [8] Bećirević, T., Eminović, I., Mehmedinović, N.I., Omeragić, E., Falan, E., Papračanin, E., *et al.* (2024) Evaluation of Platelet-Enriched Plasma Antimicrobial Effect: *In Vitro* Study. In: Badnjević, A. and Gurbeta Pokvić, L. Eds., *IFMBE Proceedings*, Springer, 22-28. https://doi.org/10.1007/978-3-031-49068-2_3
- [9] Koo, S., Bayer, A.S., Kagan, B.L. and Yeaman, M.R. (1999) Membrane Permeabilization by Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein 1 Is Modulated by Transmembrane Voltage Polarity and Magnitude. *Infection and Immunity*, **67**, 2475-2481. <https://doi.org/10.1128/iai.67.5.2475-2481.1999>
- [10] Ngo, A.T.P., Bochenek, V., Kim, H., Levine, N., Maarouf, S., Oberg, J., *et al.* (2024) Platelet Factor 4 Enhances

- Endothelial Cell Antimicrobial Activity *in Vitro* and Promotes Bacterial Clearance *in Vivo*, Improving Sepsis Outcomes. *Blood*, **144**, 1231-1231. <https://doi.org/10.1182/blood-2024-211717>
- [11] Ceresa, C., Travagin, F., Marchetti, A., Tessarolo, F., Fracchia, L., Giovenzana, G.B., *et al.* (2024) An *in Vitro* Study on the Application of Silver-Doped Platelet-Rich Plasma in the Prevention of Post-Implant-Associated Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article 4842. <https://doi.org/10.3390/ijms25094842>
- [12] Sun, L., Yu, Y., Peng, Y., Wang, D., Wang, S., Noh, I., *et al.* (2023) Platelet Membrane-Derived Nanodiscs for Neutralization of Endogenous Autoantibodies and Exogenous Virulence Factors. *Small*, **20**, e2308327. <https://doi.org/10.1002/sml.202308327>