

# 硝酸镓和万古霉素抑制表皮葡萄球菌生物膜形成的协同作用

朱元元

(解放军 86 医院临床部, 安徽当涂 243100)

**[摘 要]** 目的 观察硝酸镓和万古霉素联合应用对表皮葡萄球菌生物膜形成的影响。方法 采用半定量的分光光度法计算生物膜的形成程度。将低于最小抑菌浓度的古霉素和硝酸镓联合使用, 观察它们对表皮葡萄球菌生物膜形成的影响。结果 硝酸镓(2  $\mu\text{mol/L}$ ) 和万古霉素(1  $\mu\text{g/ml}$ ) 联合应用对表皮葡萄球菌生物膜形成的抑制率达到 99.9%, 明显高于单独使用的效果。结论 硝酸镓可以提高万古霉素对表皮葡萄球菌生物膜形成的抑制效果。

**[关键词]** 万古霉素; 硝酸镓; 葡萄球菌; 生物膜

中图分类号: R378.11 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2009)06-0499-03

## Inhibition of staphylococcus epidermidis biofilm by a combination of gallium nitrate and vancomycin

ZHU Yuan-yuan (The 86th Clinical Branch of PLA, Dangtu 243100, Anhui, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the inhibition effects of combination of gallium nitrate and vancomycin on the development of staphylococcus epidermidis biofilm. **Methods** The visible light semiquantitative method was used to measure biofilm value (OD 570). The effect of gallium nitrate and vancomycin on biofilm was evaluated under the minimum drug concentration. **Results** Gallium nitrate (2  $\mu\text{mol/L}$ ) combined with vancomycin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibited biofilm formation by *S. epidermidis* (RP 62A) by 99.9%. The inhibit effect was better than that of separately use Gallium nitrate and vancomycin. **Conclusion** Gallium nitrate can enhance the efficiency of vancomycin in inhibiting biofilm formation by *S. epidermidis*.

**[Key words]** Vancomycin; Gallium nitrate; Sepidermidis; Biofilm

近年来的研究表明, 65% 以上的人类细菌感染与生物膜有关, 尤其是导管相关感染<sup>[1]</sup>。导管相关感染最常见的病原体是表皮葡萄球菌<sup>[2]</sup>, 多为耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌引起, 当这些细菌在导管上形成细菌生物膜时万古霉素的疗效将明显下降<sup>[3,4]</sup>。细菌生物膜导致万古霉素疗效下降的原因很多, 如抗生素不能有效渗入; 细菌代谢迟缓, 对药物不敏感; 生物膜由带负电荷的胞外脂多糖形成, 可使大量的抗生素分子与其结合, 并被膜上的抗生素酶灭活等。Kaneko 等<sup>[5]</sup>发现金属镓离子( $\text{Ga}^{3+}$ )有很强的抑制细菌及细菌生物膜生成的能力。本研究在此基础上, 观察金属镓离子是否可以提高万古霉素抑制细菌形成细菌生物膜的能力。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 表皮葡萄球菌 RP62A (*Sepidermidis* RP62A, ATCC 35984) 为福建省第二人民医院中心实验室惠赠。胰酶大豆肉汤为美国 BD 公司产品。96-孔板为 Corning 公司产品; 分光光度计和酶标仪为 Bio-Rad 公司产品。硝酸镓购自福州泰瑞科技有限公司, 万古霉素为 Lilly 公司产品(批号 WM15252)。

**1.2 生物膜生长曲线测定** 参照文献[6]。将菌株划线, 获得单个菌落后, 接种胰酶大豆肉汤过夜培养。次日取菌悬液按 1:100 稀释后加入到无菌的 96-孔板, 每孔 300  $\mu\text{l}$ 。将板放到 37℃ 摇床培养 36 h。

基金项目: 南京军区医学科技创新课题(08MA054)

作者简介: 朱元元(1966-), 女, 安徽泾县人, 本科, 副主任护师, 从事医院管理及感染控制工作。

实验过程中每 12 小时更换新鲜培养基 150  $\mu\text{l}$ /孔,对照孔只加胰酶大豆肉汤。分别在第 6、10、14、18、24、30、36 和 48 小时结束培养,并将培养液小心吸出。以无菌的磷酸缓冲液(PBS;pH 7.3)洗 3 次培养板,置空气中自然干燥后以 95% 乙醇固定细菌,然后加入 200  $\mu\text{l}$  0.1% 结晶紫孵育 30 min。以自来水将未结合的结晶紫冲洗干净后在酶标仪上以 570 nm 波长测定 OD 值。根据各时间段 OD 值绘制细菌生物膜生长曲线。

**1.3 硝酸镓抑菌活性的检测** 采用比浊法测定细菌生长情况。将菌株划线,获得单个菌落后接种于 LB 液体培养基中培养至 OD 值约为 2.0 时按 1:100 比例接种到 3 ml 新鲜 LB 液体细菌培养基中。培养基中同时加入终浓度为 2、4、8、16 和 32  $\mu\text{mol/L}$  的硝酸镓,37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 14 h。次日用紫外-可见分光光度计,在波长 600 nm 处测定菌液的吸光光度值(OD<sub>600</sub>)。

**1.4 细菌生物膜形成抑制试验** 根据预实验的结果,细菌生物膜 24 h 后完全形成。硝酸镓 MIC 为 2  $\mu\text{g/ml}$ <sup>[3]</sup>,万古霉素为 2  $\mu\text{g/ml}$ <sup>[3]</sup>,的浓度下对细菌生物膜即有明显的抑制作用<sup>[5]</sup>,因此我们选用这两个浓度的二分之一为单独用药的浓度。将细菌稀释到  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  CFU/ml。试验分 4 组:A 组加入 1  $\mu\text{g/ml}$  的万古霉素,B 组加入 1  $\mu\text{g/ml}$  万古霉素和 2  $\mu\text{mol/L}$  的硝酸镓,C 组加入 2  $\mu\text{mol/L}$  硝酸镓,D 组为参考组,只加相同体积的生理盐水。按照 1.1 描述的步骤,37 $^{\circ}\text{C}$  摇床培养 24 h 后进行染色、测 OD<sub>570</sub>。生物膜抑制率的测定采用以下公式:(1-药物组 OD 值/对照组 OD 值)  $\times$  100。

**1.5 统计学处理** 实验数据采用 SPSS 10.0 统计软件分析。实验组间的比较选用单因素方差分析的 Dunnet *t* 双侧检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

**2.1 体外细菌生物膜生长曲线** 体外细菌生物膜生长曲线测定发现细菌生物膜生长表现出非线性生长趋势,36 h 出现一个较为稳定的平台期,从生长曲线可以看出细菌形成生物膜的 3 个时期,即早期(10 h)、形成期(24 h)和成熟期(36 h),试验采用 24 h 为观察点,见图 1。

**2.2 硝酸镓最小抑菌浓度的测定** 当硝酸镓浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$  时菌株生长得到抑制,当浓度  $> 4$   $\mu\text{mol/L}$  时菌液浓度明显降低;随着浓度的升高,细菌生长显著受抑;当硝酸镓浓度  $> 16$   $\mu\text{mol/L}$  时,基

本检测不到病原菌的存在,见图 2。

**2.3 万古霉素最小抑菌浓度的测定** 实验中参照的是文献报道的最小抑菌浓度,本实验未进行重复。

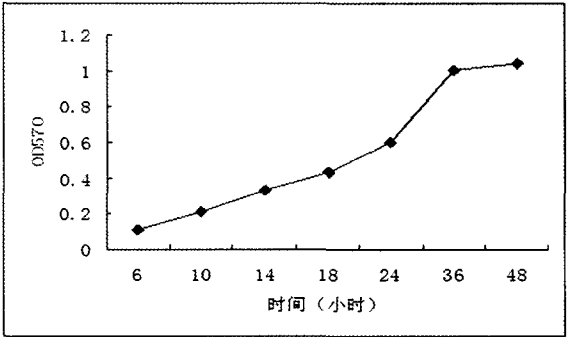


图 1 体外细菌生物膜生长曲线

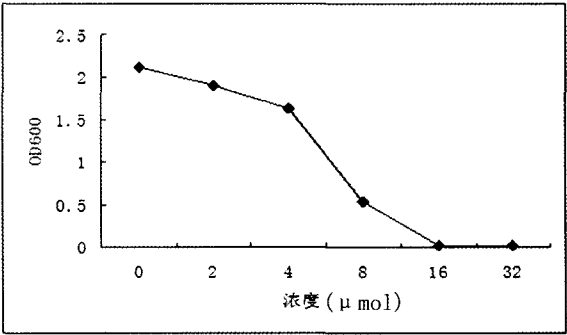


图 2 硝酸镓物对 24 h 细菌密度的影响

**2.4 硝酸镓和万古霉素联合应用对细菌生物膜的影响** 见表 1。

表 1 硝酸镓和万古霉素对细菌生物膜的抑制作用(%)

试验次数	A 组	B 组	C 组
1	62.7	99.9	56.4
2	58.3	99.9	55.9
3	32.7	99.8	59.8
抑制平均值	51.2 $\pm$ 16.2	99.9 $\pm$ 0.4*	57.4 $\pm$ 2.1

注:每次试验数据为 3 个孔的平均值;与 A、C 组相比,\*  $P < 0.05$

## 3 讨 论

由于细菌生物膜具有极强的耐药性和抵抗机体免疫系统作用的能力,感染细菌生物膜的组织 and 污染细菌生物膜的生物材料,即使应用成倍于正常剂量的药物也难以治愈,最终将危及患者生命。怎样防治由细菌生物膜所引起的难治性感染是临床上亟待解决的问题之一。细菌生物膜的耐药机制比游离

细菌的耐药机制更加复杂<sup>[7]</sup>。生物膜由带负电荷的胞外脂多糖形成,可使大量的抗生素分子与其结合,同时许多抗生素水解酶可以固定在生物膜上,使进入膜的抗生素被灭活。细菌生物膜里层菌的细菌体积小,分裂不活跃,对抗生素通透性降低。在这些因素的影响下,生物膜内细菌便有足够的时间启动抗生素的耐药基因,如抗生素水解酶的基因表达<sup>[8]</sup>。

因为几乎所有的微生物生长和代谢的主要酶都以 Fe 为辅助因子,包括 DNA 合成酶,呼吸链中电子传递相关的酶和氧化应急相关的酶。研究还表明在生物膜的形成早期必须依赖高浓度的 Fe。为此有研究人员采用 Fe 螯合剂降低体内 Fe 离子浓度的方法来抑制细菌,但效果不好,因为螯合剂中的 Fe 仍然可以被细菌利用,而且细菌有很强的富集 Fe 离子的能力。如绿脓杆菌至少有 30 个基因编码 Fe 离子受体。2007 年 Kaneko 等发现金属镓离子( $Ga^{3+}$ )有很强的抑制细菌及细菌生物膜生成的能力。镓离子和 Fe 离子有相近的离子半径,许多生物反应系统无法将  $Ga^{3+}$  和  $Fe^{3+}$  区分开来。由于  $Ga^{3+}$  不能被还原,不能传递电子,因此可以干扰以 Fe 为底物的氧化还原反应。

在医用体内植入材料应用中,对生物膜形成的预防和控制比生物膜形成后再利用药物杀灭它显得更为重要及有效。为了预防万古霉素耐药菌的出现,美国疾控中心建议停止采用万古霉素预防留置导管的感染。我们的体外研究表明,万古霉素的抗

葡萄球菌能力在合用硝酸镓时可得到明显的加强。由于硝酸镓在美国已获得 FDA 批准用于治疗高钙血症,我们将对它们的体内疗效进行进一步的研究。

## 参考文献

- [1] Mermel LA. Prevention of intravascular catheter-related infections [J]. *Ann Intern Med*, 2000, 132(5):391-402.
- [2] Sitges-Serra A, Girvent M. Catheter-related blood stream infections [J]. *World J Surg*, 1999, 23(6):589-595.
- [3] Lee CK, Rubin LG, Molwin R. Synergy between protamine and vancomycin in the treatment of staphylococcus epidermidis biofilms [J]. *Urology*, 1994, 45(4):720-724.
- [4] Raad I, Alarawan A, Rolston K. Staphylococcus epidermidis: emerging resistance and need for alternative agents [J]. *Clin Infect Dis*, 1998, 26(5):1182-1187.
- [5] Kaneko Y, Thoendel MO, Lakanmi O, et al. The transition metal gallium disrupts pseudomonas aeruginosa iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(3):877-888.
- [6] Mack D, Siemseen N, Laufs R. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent Staphylococcus epidermidis; evidence for functional relation to intercellular adherence [J]. *Infect Immun*, 1992, 60(12):2048-2057.
- [7] Costerton JW. Overview of microbial biofilms [J]. *J Ind Microbiol*, 1995, 15(1):137-140.
- [8] Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials [J]. *Adv Dent Res*, 1997, 11(1):160-167.

(收稿日期:2009-08-25;修回日期:2009-09-25)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)

(上接第 492 页)

- [2] Tile M. Pelvic ring fractures: should they be fixed [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1988, 70(1):1-12.
- [3] Matta JM, Tornetta P. Internal fixation of unstable pelvic ring fractures [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1996, 329(8):129-140.
- [4] 郑志群, 杜文革, 钱何布, 等. 床旁介入性血管栓塞术救治重度骨盆骨折患者 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2006, 15(3):260-262.
- [5] Smith W, Williams A, Agudelo J, et al. Early predictors of mortality in hemodynamically unstable pelvis fractures [J]. *J Orthop Trauma*, 2007, 21(1):31-37.

- [6] 袁欣华, 庞清江, 吴乃庆, 等. 切开复位内固定治疗骨盆桶柄样 Tilt 骨折 [J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2007, 22(1):4-6.
- [7] 田野, 付勤. 外固定架阶段加压联合重建钢板治疗陈旧性 Tile B1 型骨盆骨折 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(3):324-327.
- [8] Bellabarba C, Ricci WM, Bolhofner BR. Distraction external fixation in lateral compression pelvic fractures [J]. *J Orthop Trauma*, 2006, 20(1 Suppl):7-14.

(收稿日期:2009-02-05;修回日期:2009-03-23)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)