

· 论 著 ·

# 硝酸镓可降解涂层的体外抗菌实验

朱元元<sup>1</sup>, 杨双旺<sup>2</sup>, 邱 彦<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的 铜绿假单胞菌是医疗器械相关感染的主要致病菌,其持续感染的特性被认为与其具有形成附着生物膜的能力有关。本研究探讨硝酸镓涂膜对形成生物膜的抑制作用。**方法** 将硝酸镓、明胶、EDTA 按照一定的比例混合后涂于聚氯乙烯(PVC)片表面,然后采用 Kirby-Bauer 法考察铜绿假单胞菌在 PVC 表面形成生物膜的情况并进行评估。**结果** 表面涂有硝酸镓的 PVC 板在铜绿假单胞菌平板上形成的抑菌圈的直径大于 20 mm,减少了细菌在表面的聚集并抑制了生物膜的形成。**结论** 用硝酸镓涂膜对 PVC 表面进行前处理可抑制铜绿假单胞菌的生长和生物膜的形成。

**[关键词]** 医疗器械;硝酸镓;涂层;抗菌活性;细胞黏附

**[中图分类号]** R318.08 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.04.004

## Evaluation of antimicrobial efficacy of gallium-coated PVC in vitro

ZHU Yuan-yuan<sup>1</sup>, YANG Shuang-wang<sup>2</sup>, QIU Yan<sup>3</sup>. 1. Department of Administration, 2. Department of Infection Control, 3. Department of Pharmacy, 454 Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

**[Abstract]** **Objective** *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main bacterial stain that cause device-associated infections. *Pseudomonas aeruginosa* may adhere to the surface of devices and form biofilm, which is responsible for the persistent infection. The present study was aimed to test the antimicrobial efficacy of gallium-coated PVC. **Methods** The antimicrobial efficacy of PVC segments coated through an instant dip method with gallium was determined. Using the modified Kirby-Bauer method, gallium-coated PVC against *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated. **Results** Gallium-coated PVC maintained a zone of inhibition of >20 mm against *Pseudomonas aeruginosa* for 1 week. Gallium-coated PVC significantly reduced the amount of viable *Pseudomonas aeruginosa* organisms adhering to their surfaces when compared with control. **Conclusion** Gallium-coated PVC impregnated using an instantaneous dip method, were shown to have prolonged antimicrobial durability and high efficacy in inhibiting adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to PVC surface and formation of biofilm.

**[Key words]** medical devices; gallium nitrate; coating; antimicrobial activity; bacterial adherence

细菌可在各种生物和非生物的表面形成生物膜,生物膜包含蛋白质、多糖和核酸等基质。生物膜形成是一个复杂的发展过程<sup>[1-4]</sup>,生物膜在器械相关的感染发病机制中扮演重要角色。细菌生物膜的形成是院内感染的重要来源,可导致导尿管、血管内导管相关的菌血症和呼吸机相关性肺炎<sup>[5-6]</sup>。生物膜的形成使细菌避开免疫系统的攻击,因为在生物膜中的细菌有基质的保护,且细胞的代谢速度较慢,使它们能够在高于最小抑菌浓度 100 ~ 1000 倍的抗生素中生存下去<sup>[7-9]</sup>。而大量使用抗生素则增加了抗生素耐药性<sup>[10-11]</sup>,因此对新的抗菌药物的需求日益迫切。

在几乎所有的病原体中,铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ )在 DNA 合成、呼吸链和关键酶的功能和氧化应激防御反应中均有重要作用,是细菌生长所必需的<sup>[12]</sup>。金属镓

的离子半径几乎和铁一样,而且许多生物都无法区分镓离子( $\text{Ga}^{3+}$ )和  $\text{Fe}^{3+}$ ,因此  $\text{Ga}^{3+}$  可用以破坏依赖  $\text{Fe}^{3+}$  的生化反应。体外和体内研究表明  $\text{Ga}^{3+}$  通过干扰  $\text{Fe}^{3+}$  的功能,可抑制各种病原体生长<sup>[13]</sup>。

本课题组的前期研究中已制备了一种可以黏附在塑料表面的硝酸镓聚合物<sup>[14]</sup>。本研究对此材料以硝酸镓聚合物包被并对其抗菌活性进行对比分析。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源和培养**<sup>[15]</sup> 铜绿假单胞菌(ATCC27853)购自国家卫生部临床检验中心。铜绿假单胞菌在 LB 液体培养基(培养基由 10.0 g/L 的蛋白胨,5.0 g/L 的酵母提取物,10.0 g/L 的氯化钠组成,pH 7.0 ~ 7.2),37 ℃ 下振荡培养 24 h。收集菌种并用生理盐水稀释。

**1.2 最小抑菌浓度的测定**<sup>[14]</sup> 37 ℃ 过夜培养的试验菌株用新鲜的胰蛋白酶大豆肉汤稀释 10 倍。

基金项目:南京军区医学科技创新课题(08MA54)

作者单位:210002 江苏南京,解放军 454 医院,1. 院办公室,2. 感控科,3. 药剂科

由于吸光度和细菌密度成正比,因此采用酶标仪测其在 600 nm 处的吸光度(OD 值)作为相对定量,并以此代表细菌的生长程度。37 °C 下培养试验菌株以酶标仪测其 600 nm 的 OD 值达到 1.5 左右,即为达到实验所需的指数生长阶段。将其加入到含不同浓度硝酸镓的孔中,无菌对照孔不加细菌,阳性对照孔不加硝酸镓。

**1.3 表面涂层** 0.5% 的明胶水溶液高压灭菌。冷却后,将明胶溶液、硝酸镓(Sigma 公司产品)和乙二胺四乙酸(EDTA)溶液混合,硝酸镓终浓度为 20  $\mu\text{M}$ , EDTA 的终浓度为 10  $\mu\text{M}$ 。将聚氯乙烯(polyvinyl chloride polymer, PVC)片用打孔机制成直径 6 mm 的圆片,用无水乙醇、去离子水超声波振荡清洗 15 min,放入清洁干燥的青霉素空瓶中,瓶口以单层牛皮纸包扎。经 15 磅 15 ~ 20 min 高压消毒后,放在 37 °C 温箱 2 d,使完全干燥。将薄片浸入到上述明胶-硝酸镓-EDTA 混合液,取出置于超净台中自然干燥,备用。

**1.4 抗生物膜持久性检测<sup>[14]</sup>** 将 10 mL 消毒的尿液置于 50 mL 聚苯乙烯管(Falcon 公司产品)。加入薄片,37 °C 静置。分别在 1、2、4、7 d 后取出薄片,无菌过滤纸吸干,进行 Kirby-Bauer 法(K-B 法)扩散试验。在超净台中,严格按无菌程序用接种环挑取适量细菌培养物,以划线方式将细菌涂布到平皿培养基上,再取薄片贴到 LB 固体培养基(每升含蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、氯化钠 10 g 和琼脂 15 g)表面,在平皿中央贴 1 片,外周等距离贴 5 片,使薄片与培养基紧密相贴。将平皿培养基置于 37 °C 温箱中培养 24 h 后,测量抑菌圈的直径。

采用稀释法测定膜上依附的细菌数量。分别取不做处理的 PVC 片和经过涂层处理的 PVC 片各 6 片,置于含 20 mL 铜绿假单胞菌 LB 培养液,37 °C 恒温培养 7 d。取经培养的 PVC 片置于 5 mL 生理盐水震荡 30 min,倒出生理盐水,再加 1 mL 生理盐水震荡 15 min 后取出薄片,合并生理盐水以 10 倍梯度连续稀释至 10 000 倍,各梯度样本分别以 0.1 mL 量加入无菌 LB 固体培养基培养皿中涂布培养,置 37 °C 培养 18 h,观察菌落生长情况,作菌落计数。按以下公式计算出细菌数:细菌数 = 菌落数  $\times$  稀释倍数  $\times 10$ 。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数理统计,实验所得计量数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间均数间的两两比较采用独立样本  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 最小抑菌浓度(MIC)的测定** 在 96 孔板中将细菌接种于含硝酸镓 5 ~ 30  $\mu\text{M}$  的培养液中。37 °C 培养 24 h 后测定 600 nm 的 OD 值。结果显示,硝酸镓剂量依赖性地抑制细菌生长, MIC 约为 20  $\mu\text{M}$ 。

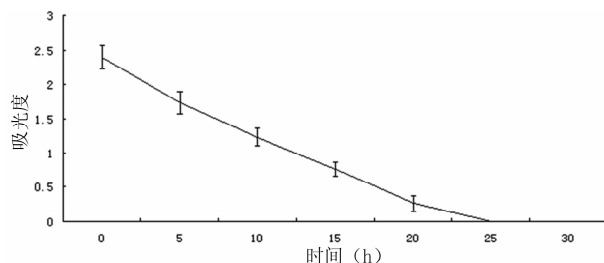


图 1 硝酸镓对铜绿假单胞菌的抑制作用

**2.2 对生物膜的抑制作用** 将 PVC 片在尿液中浸泡 1 ~ 7 d 后,测定 PVC 片的抑菌作用。7 d 后 K-B 扩散试验显示,抑菌圈均保持在 20.0 mm 以上[第 0、1、2、4、7 天抑菌圈直径分别为  $(22.1 \pm 1.3)$  mm、 $(22.3 \pm 1.2)$  mm、 $(21.8 \pm 0.9)$  mm、 $(21.1 \pm 0.7)$  mm、 $(20.1 \pm 1.7)$  mm],组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),抑菌效果较为稳定。

为了进一步评价硝酸镓涂膜抑制细菌生物膜形成的能力,分别将经硝酸镓处理过的和未处理过的 PVC 片放到铜绿假单胞菌的细胞悬液中,并在 37 °C 条件下培养 24 h,无需振荡,再采用稀释法分别测定膜上依附的细菌数量。结果显示,未处理的 PVC 片上每片的平均细菌数为  $(2.29 \pm 0.13) \times 10^7$  个,而处理过的为  $(3.33 \pm 0.92) \times 10^3$  个,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

越来越多的临床治疗需要使用植入式器械。这些器械,不论是作为短期使用还是植入体内终身使用,均可因为细菌生物膜的形成导致严重的全身感染。这在整形外科中极为常见,细菌生物膜的形成会导致严重的并发症,包括义肢感染等,致死亡率和医疗费用的增加<sup>[16-17]</sup>。本文研究了常用作医疗植入材料的 PVC 上的硝酸镓涂层对生物膜形成的影响。

生物膜的形成是个复杂的发展过程,包括细菌黏附和表面固定形成菌落,并融合生物膜<sup>[14]</sup>。生物膜的消除亦非常困难,固定在生物膜中的细菌比游离状态的细菌更耐抗生素。已经证明用  $\text{Ga}^{3+}$  取代  $\text{Fe}^{3+}$  可以干扰细菌 DNA 和蛋白质的合成,抑制细菌

生物膜的形成。 $\text{Ga}^{3+}$  已被 FDA 批准治疗恶性高钙血症,具有很好的安全性,本文硝酸镓终浓度为  $20 \mu\text{M}$ 。明胶是以动物的皮、骨为原料制成的蛋白分子聚物质。明胶分子结构上有大量的羟基、羧基和氨基,使得明胶具有极强的亲水性,又因其具有无毒、生物相容性好并在生物体中可完全降解等优点,故选用明胶作为溶解基质。结果表明,涂布 EDTA-镓-明胶的 PVC 具有较好的抗菌作用。将 EDTA-镓-明胶涂覆在 PVC 表面,在防止医疗器械感染上的用途值得进一步研究。

## 【参考文献】

- [1] O' Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development[J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54(1): 49-79.
- [2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP, et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [3] Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections [J]. Cell Microbiol, 2009, 11(7): 1034-1043.
- [4] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms[J]. Lancet, 2001, 358(9276): 135-138.
- [5] Adair CG, Gorman SP, Feron BM, et al. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia [J]. Intensive Care Med, 1999, 25(10): 1072-1076.
- [6] Koerner RJ. Contribution of endotracheal tubes to the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia [J]. J Hosp Infect, 1997, 35(1): 83-89.
- [7] Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR, et al. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic re-

sistance [J]. Biomaterials, 2006, 27(10): 2331-2339.

- [8] Raad II, Hanna HA. Intravascular catheter-related infections; new horizons and recent advances [J]. Arch Intern Med, 2002, 162(5): 871-878.
- [9] Donlan RM. Biofilms and device-associated infections [J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(2): 277-281.
- [10] Mah TF, O' Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents [J]. Trends Microbiol, 2001, 9(1): 34-39.
- [11] 曾宏逵, 谭伟龙, 钱万红, 等. 过氧乙酸复方消毒剂杀灭枯草杆菌芽孢的实验研究 [J]. 东南国防医药, 2010, 12(2): 97-99.
- [12] Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, et al. Iron and infection: the heart of the matter [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 43(2): 325-330.
- [13] Kaneko Y, Thoendel M, Olakanmi O, et al. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity [J]. J Clin Invest, 2007, 117(4): 877-888.
- [14] Zhu Y, Jin F, Yang S, et al. Pre-treatment with EDTA-gallium prevents the formation of biofilms on surfaces [J]. Exp Ther Med, 2013, 5(4): 1001-1004.
- [15] 朱元元. 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 [J]. 东南国防医药, 2009, 11(6): 499-501.
- [16] Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, et al. Biofilm formation on dental restorative and implant materials [J]. J Dent Res, 2010, 89(3): 657-665.
- [17] Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, et al. Biofilm formation in staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials [J]. Biomaterials, 2012, 33(10): 5967-5982.

(收稿日期: 2014-04-22; 修回日期: 2014-05-28)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

(上接第 345 页)

- [3] 赵永强, 张广泉, 崔力扬, 等. 单开门椎管成形侧块钢板内固定术治疗多节段颈椎管狭窄症 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(4): 395-396.
- [4] 杨海云, 顾锐, 朱本清, 等. 影响单开门椎管扩大成形术治疗颈椎病疗效的术后相关因素分析 [J]. 中华骨科杂志, 2009, 29(9): 847-851.
- [5] Barrett I, Justin H, Joon L, et al. Laminoplasty versus laminectomy and fusion for multilevel cervical spondylotic myelopathy [J]. Clin Orthop Relat Res, 2011, 469(3): 688-695.
- [6] 林久灶, 林泉, 崔为良. 带线锚钉在颈椎单开门椎管扩大椎板成形术中的应用 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2013, 28(1): 43-44.
- [7] 苗洁, 申勇, 王林峰, 等. 颈椎后路三种手术方式对改善多节段颈椎病生理曲度及疗效的远期观察 [J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(11): 987-981.

- [8] 苗洁, 李冠军, 葛志强, 等. Centerpiece 系统治疗多节段脊髓型颈椎病疗效观察 [J]. 实用骨科杂志, 2013, 19(8): 735-738.
- [9] 马大年, 李健, 时梦琥. 颈椎前路减压钛网植骨钛板固定治疗脊髓型颈椎病 [J]. 东南国防医药, 2012, 14(1): 66-67.
- [10] Wang JM, Roh KJ, Kim DJ, et al. A new method of stabilising the elevated laminae in open-door laminoplasty using an anchor system [J]. J Bone Joint Surg (Br), 1998, 80(12): 1005-1008.
- [11] 李玉伟, 王海蛟, 严晓云, 等. 颈椎单开门椎管扩大成形术不同椎板固定方法治疗多节段脊髓型颈椎病的疗效分析 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(11): 973-978.
- [12] 王义生, 张弛, 唐国皓, 等. 锚定钉在多节段脊髓型颈椎病单开门椎管扩大术中的应用 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2012, 22(1): 20-23.

(收稿日期: 2014-03-20; 修回日期: 2014-04-16)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)