

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.04.002

· 论 著 ·

硝酸镓对临床分离金黄色葡萄球菌生物膜的体外清除作用

吴浩昕¹, 李 蓉², 葛 新²

(1 武警后勤学院附属医院, 天津 300162; 2 武警后勤学院, 天津 300309)

[摘要] **目的** 研究新型抗菌剂硝酸镓对金黄色葡萄球菌生物膜的清除作用, 探索抑制细菌生物膜的新方法。**方法** 采用结晶紫染色法, 对临床分离的 14 株金黄色葡萄球菌进行生物膜阳性菌株筛选, 检测硝酸镓对生物膜阳性菌株的最低抑菌浓度(MIC)和对生物膜的清除作用。**结果** 14 株金黄色葡萄球菌中, 生物膜阳性菌株 9 株。硝酸镓对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、生物膜阴性菌株以及 9 株生物膜阳性菌株的 MIC 均为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。硝酸镓对金黄色葡萄球菌早期生物膜的清除率为 $(86.53 \pm 0.96)\%$, 高于对晚期生物膜的清除率 $[(62.54 \pm 1.53)\%]$ ($t = 35.699, P < 0.001$)。**结论** 硝酸镓具有抑制金黄色葡萄球菌增殖, 清除其生物膜的作用, 有望成为防治金黄色葡萄球菌感染的新型药物。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 生物膜; 硝酸镓; 清除

[中图分类号] R378.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)04-0223-04

In vitro clearance effects of gallium nitrate on biofilms of clinically isolated *Staphylococcus aureus*

WU Hao-xin¹, LI Rong², GE Xin² (1 The Affiliated Hospital of Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; 2 Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of new type antiseptic gallium nitrate on the clearance of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) biofilm, and explore new methods for suppressing bacterial biofilm formation. **Methods** Biofilm positive strains were screened among 14 clinically isolated *S. aureus* strains by crystal violet staining method, minimal inhibitory concentration (MIC) of gallium nitrate for biofilm positive strains and effect of gallium nitrate on the clearance of biofilm were measured. **Results** Of 14 *S. aureus* isolates, 9 were biofilm positive strains; gallium nitrate MICs for *S. aureus* ATCC 25923, biofilm-negative strain, and 9 biofilm positive strains were all 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; the clearance rate of gallium nitrate for early biofilm of *S. aureus* was significantly higher than mature biofilm $[(86.53 \pm 0.96)\% \text{ vs } [62.54 \pm 1.53)\%, t = 35.699, P < 0.001]$. **Conclusion** Gallium nitrate can inhibit growth of *S. aureus* strains and clear biofilm, it can be applied in the prevention and control of *S. aureus* infection.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; biofilm; gallium nitrate; clearance

[Chin Infect Control, 2015, 14(4): 223-226]

金黄色葡萄球菌是医院感染和社区感染的重要病原菌, 其感染类型多样, 从浅表的皮肤软组织感染到致死性的重症脓毒症均可见到。此外, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染治疗难度大, 病死

率高, 受到临床高度重视^[1]。金黄色葡萄球菌感染的难治性与生物膜形成密切相关, 特别是其引起的心内膜炎、骨髓炎和植入性医疗装置感染^[2]。金黄色葡萄球菌通过释放多糖、DNA 和蛋白质等形成包

[收稿日期] 2014-10-10

[基金项目] 武警后勤学院科研基金面上项目(WHM201202)

[作者简介] 吴浩昕(1974-), 女(汉族), 山西省朔州市人, 护师, 主要从事特殊污染物的消毒灭菌研究。

[通信作者] 葛新 E-mail: bigxer@163.com

被物,黏附于组织或生物材料表面形成生物膜。生物膜难以清除,并对抗菌药物和机体免疫具有较强抵抗性。因此,抑制生物膜形成成为金黄色葡萄球菌感染防治的重要研究内容。金属镓离子(Ga^{3+})作为一种新型抗菌剂近年来受到关注,有实验表明其在体内外对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的增殖以及生物膜形成具有明显抑制作用,作用机制为镓离子干扰细菌的铁代谢系统,阻断以铁为底物的氧化—还原反应^[3-4]。本研究观察 Ga^{3+} 的常用制剂硝酸镓在清除金黄色葡萄球菌生物膜中的作用,以评价 Ga^{3+} 在金黄色葡萄球菌感染防治中的价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料 金黄色葡萄球菌 14 株(菌株号 W15~W28)为武警后勤学院附属医院临床分离菌株,经法国生物梅里埃 VITEK 2 细菌鉴定仪鉴定。硝酸镓购自 Sigma 公司,胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基和结晶紫染色液购自北京陆桥技术股份有限公司,酶标仪型号为 Bio-Rad 550。

1.2 试验方法

1.2.1 筛选生物膜阳性菌株 生物膜检测采用结晶紫染色法^[5]。该方法依据形成生物膜的菌株黏附力强,附着于介质表面后不易洗脱,经染色后用有机溶剂溶解,其颜色深度可以反映生物膜的形成程度。具体方法如下:将待测菌株培养液稀释至 2×10^7 CFU/mL,取 125 μ L TSB 培养基加入 96 孔板,每孔再加入 1.25 μ L 待测菌稀释液,37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h。然后将孔中的菌液按 1:100 转移到另一块 96 孔板中的新鲜培养基中,继续在 37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h,使细菌黏附在孔壁上形成生物膜,每株菌设 4 个复孔。培养结束后弃去菌液,用无菌 PBS 缓冲液洗去游离细菌。取 175 μ L 结晶紫染色液加入到培养孔中,染色 1 min 后弃去染液,用 PBS 缓冲液洗净多余染料,室温放置 1 h。待培养孔干燥后每孔加入 200 μ L 二甲基亚砜,使黏附在孔壁上的结晶紫完全溶解。用酶标仪检测 A_{550} 吸光度值,结果取 4 孔的平均值。设只含培养基不含细菌的孔作为空白孔,实验孔 A_{550} 值大于空白孔 4 倍以上为生物膜阳性菌株。

1.2.2 硝酸镓对金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度(MIC)检测 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)微量肉汤稀释法^[6]进行检测。96 孔板中硝酸镓药物浓度由 512 μ g/mL 对倍稀释至 1 μ g/mL,

每孔加入待测菌(终浓度为 5×10^5 CFU/mL)。以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作为标准菌株,以生物膜筛选试验中 A_{550} 值最低的金黄色葡萄球菌 W21 作为生物膜阴性对照菌株,每株菌重复测 4 次,结果取重复出现次数最多的 MIC 值。

1.2.3 硝酸镓对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制 按 1.2.1 的方法用两块 96 孔板培养金黄色葡萄球菌,其中一块培养板用于形成早期生物膜(12 h),另一块形成成熟生物膜(24 h)。生物膜形成后弃去菌液,两块培养板每孔加入 18 μ g/mL 的硝酸镓溶液 150 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h,用 1.2.1 中的方法染色、检测。每株菌设 3 个复孔,结果取平均值,以不经药物处理的孔为对照组。生物膜抑制率计算:(1-实验组 A_{550} /对照组 A_{550}) \times 100%。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行配对 t 检验,以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物膜阳性菌株筛选结果 14 株临床分离的金黄色葡萄球菌经结晶紫染色法检测,9 株 A_{550} 值介于 0.67~1.02,大于对照孔(0.13)4 倍以上,为生物膜阳性菌株,阳性率为 64.29%。见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌生物膜检测结果(A_{550} 平均值)

Table 1 Screening results of biofilm of *S. aureus* (mean values of A_{550})

菌株	A_{550}	菌株	A_{550}
W15	0.72	W23	0.50
W16	0.67	W24	0.94
W17	0.70	W25	0.40
W18	0.86	W26	0.95
W19	0.48	W27	0.82
W20	0.78	W28	0.44
W21	0.39	对照孔	0.13
W22	1.02		

2.2 硝酸镓对金黄色葡萄球菌的 MIC 硝酸镓对金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC 25923、生物膜阴性菌株 W21 以及 9 株生物膜阳性菌株 MIC 均为 16 μ g/mL,表明硝酸镓对试验菌株与对照菌株抑制作用的一致性。见表 2。

2.3 硝酸镓对金黄色葡萄球菌生物膜的清除作用 18 μ g/mL 硝酸镓溶液对 9 株金黄色葡萄球菌早期生物膜清除率为(86.53 \pm 0.96)%,表现出较强的清除作用;对成熟生物膜清除率为(62.54 \pm

1.53)%,作用程度有所下降。经统计学分析,硝酸镓对试验菌株早期生物膜的清除率高于成熟生物

膜($t = 35.699, P < 0.001$)。

表 2 硝酸镓对金黄色葡萄球菌的 MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Table 2 Gallium nitrate MIC for *S. aureus* strains ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

金黄色葡萄球菌	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	MIC
生物膜阳性株 W15	16	16	32	16	16
生物膜阳性株 W16	16	16	16	16	16
生物膜阳性株 W17	32	16	16	16	16
生物膜阳性株 W18	16	16	16	32	16
生物膜阳性株 W20	16	16	16	16	16
生物膜阳性株 W22	16	16	16	16	16
生物膜阳性株 W24	16	32	16	16	16
生物膜阳性株 W26	16	16	16	32	16
生物膜阳性株 W27	16	16	16	16	16
标准菌株 ATCC 25923	16	32	16	16	16
生物膜阴性株 W21	32	16	16	16	16

3 讨论

细菌生物膜是由细菌依靠胞外分泌物而黏附于人体组织或生物材料表面形成的微生物集落,是细菌群体生长的一种普遍现象。据统计 65% 的慢性细菌性感染与生物膜形成有关^[7],细菌生物膜在感染性疾病中的重要性越来越受到重视。细菌形成生物膜后难以清除,并可不断释放出游离细菌,成为慢性感染的感染源。抗菌药物可杀灭游离细菌,但不能有效清除细菌生物膜及杀灭生物膜中的细菌。主要原因为生物膜表面存在细菌分泌的多糖基质等物质,对抗菌药物有物理屏障作用,且生物膜内细菌代谢水平降低,对抗菌药物敏感性降低^[8]。这导致单纯依靠抗菌药物很难完全治愈有生物膜形成的感染,因此,探索新型细菌生物膜抑制药物成为抗感染领域的重要研究内容。

近年来,无机物的抗菌作用在国外逐渐受到重视。研究人员发现硅酸铜(copper silicate)和焦亚硫酸钠(sodium metabisulfite)对游离的葡萄球菌及其生物膜具有抑制作用^[9-10]。硝酸镓的抗菌作用最早发现于铜绿假单胞菌,此后镓离子(Ga^{3+})对其他细菌的抑制性也受到关注。镓对铁的竞争性抑制是其抗菌的主要机制。铁是微生物生长以及维持关键酶功能不可缺少的元素,三价铁离子(Fe^{3+})在细菌体内参与氧化—还原过程转变为二价铁离子(Fe^{2+})。镓作为一种过渡金属元素,有与铁元素相似的离子半径,能够竞争性地阻断 Fe^{3+} 与蛋白质和螯合剂结合,但 Ga^{3+} 在细菌体内不能被还原,抑制

了依赖于铁电子捕获的氧化—还原反应,干扰细菌的 DNA 与蛋白质合成^[3]。

本研究采用的 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硝酸镓(相当于对游离金黄色葡萄球菌的 MIC)对金黄色葡萄球菌生物膜有明显的清除作用,特别是对早期生物膜的作用更为显著,这很可能是硝酸镓干扰细菌的代谢系统,从而阻断生物膜初期黏附。而当生物膜成熟后,由于细菌外基质的屏蔽,硝酸镓对生物膜清除活性有所降低。对于成熟生物膜的清除,在进一步研究中可以考虑将硝酸镓与其他类型抗菌剂联合使用,以期发挥协同抗菌作用。由于硝酸镓对游离细菌和早期生物膜的较高抗菌活性,除了全身给药外,还可以将其合成在生物材料中(如在人工植入物表面覆盖硝酸镓涂层),从源头上阻止生物膜的形成。硝酸镓毒性较低,已通过了美国食品药品监督管理局(FDA)的批准用于治疗肿瘤性高钙血症^[3]。本研究结果显示,硝酸镓具有抑制金黄色葡萄球菌增殖和清除其生物膜的作用,有望成为控制金黄色葡萄球菌感染的新型药物。

[参考文献]

- [1] 张明霞,许铮,周惠琴,等. 社区获得性和医院获得性金黄色葡萄球菌感染比较[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(5): 363-365.
- [2] Cue D, Lei M G, Lee C Y. Activation of *sarX* by Rbf is required for biofilm formation and *icaADBC* expression in *Staphylococcus aureus* [J]. J Bacteriol, 2013, 195(7): 1515-1524.
- [3] 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.
- [4] 葛新, 王辉, 董小青. 硝酸镓对尿路致病性大肠埃希菌及其生物膜的抑制作用[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2013, 13(2): 136-139.
- [5] Danese P N, Pratt L A, Dove S L, et al. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 37(2): 424-432.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-eighth edition [S]. CLSI document M07-A8. Wayne, PA:CLSI, 2009.
- [7] Cvitkovich D G, Li Y H, Ellen R P. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(11):1626-1632.
- [8] Sadykov M R, Bayles K W. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2012, 15(2): 211-215.
- [9] Frank K L, Patel R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 57(4):355-359.
- [10] Carson K C, Bartlett J G, Tan T J, et al. In vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* to a new antimicrobial, copper silicate [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(12):4505-4507.

(本文编辑:周鹏程)

· 信息 ·

《中国感染控制杂志》征订征稿启事

《中国感染控制杂志》(月刊, ISSN 1671-9638; CN 43-1390/R; 邮发代号 42-203)是国家教育部主管,中南大学(湘雅医院)主办的国内外公开发行的国家级感染性疾病专业学术期刊。本刊为中国科技论文统计源与核心期刊,并被《美国化学文摘》(CA)、《俄罗斯文摘》杂志(AJ)、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》(WPRIM)、《中国生物医学文献数据库》(CBM)、《中国期刊全文数据库》(CNKI)、《万方—数字化期刊群》及《中文生物医学期刊文献数据库》(CMCC)等国内外重要检索机构收录。

本刊以感染预防控制为主,涵盖临床医学、临床流行病学、临床微生物学、医院感染监测与控制等,主要刊载感染疾病学理论、实践、科研、教学和管理最新成果和经验;栏目包括专家论坛、论著、经验交流、病例报告、综述、译文、国内外学术动态等。欢迎各相关专业医务人员及疾病预防与控制人员订阅(15元/期,全年180元)、赐稿(网址:www.zggrkz.com)。

本刊承诺,投至本刊的国家级基金项目或高质量研究论文经审稿通过,承诺在收稿2~4个月内刊登;省级基金项目审稿通过,承诺在收稿4~6个月内刊登。稿件一经刊用,编辑部将致薄酬并赠送第一作者《中国感染控制杂志》12期。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路87号 中国感染控制杂志社(编辑部) 邮编:410008

网址:www.zggrkz.com; www.cjicp.com

E-mail:zggrkz2002@vip.sina.com

电话(传真):0731-84327658

中国感染控制杂志编辑部