

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.11.042

抗生物被膜类医用植入材料的未来发展展望*

马群¹ 赵军旗¹ 张媛媛¹ 蔡韬¹ 马延和^{1,2}

(1 工业酶国家工程实验室 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308;

2 微生物资源前期开发国家重点实验室 中国科学院微生物所 北京 100101)

摘要:生物被膜极大提高了微生物本身的耐药性(比浮游态细菌高 1000-倍)和对环境的适应能力(温度、压强、氧化剂、以及 pH),而另一方面医用材料本身会导致异物入侵造成的机体免疫力下降。因而,生物被膜给医用材料植入带来了更大的感染风险,也推动了医用抑菌材料的不断改进和发展。对医用材料中微生物组成的研究以及生物被膜形成机理的逐步揭示成为了抑菌材料发展的导向。抑菌材料的改性主要通过更换材质和形成涂层等方式来改变材料表面的物化性质,其中涂层法是目前被大量尝试的热点。本文简要介绍了医药材料在安全性方面面临的问题以及生物被膜理论研究的主要成果,并详细讨论了抗生素、抑菌金属离子、氧化剂、群体感应淬灭分子、酶等被尝试用于材料涂层抑制生物被膜形成的原理、实例、以及优劣。最后,本文对未来抗生物被膜类抑菌材料的发展趋势进行了展望。

关键词:生物被膜;植入材料;抑菌方法

中图分类号:R318;R117 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)11-2150-04

Future Strategies for the Biofilm Inhibition on Medical Implants*

MA Qun¹, ZHAO Jun-qi¹, ZHANG Yuan-yuan¹, CAI Tao¹, MA Yan-he^{1,2}

(1 National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences,

Tianjin, 300308, China; 2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences,

Beijing, 100101, China)

ABSTRACT: Biofilms dramatically increase the bacterial antibiotic resistance (1000-fold increased compared with the planktonic cells) and environmental stress resistance (temperature, stress, oxidant, and pH). On the other hand, the medical implant intrusion caused the immunity decreasing. Hence, the biofilms bring a higher infection risk for biomaterial implantation. The bacterial composition and mechanism for biofilm development are critical for future biomaterial development. The modification of medical implants is accomplished by changing the material type or covering a surface coating, which both change the physicochemical properties of the material surface. In this review we listed the mechanism and examples for biofilm inhibition via antibiotics, metal ions, oxides, QS-related molecules, and enzymes. In the end, we also talked about the future trends for biofilm control methods.

Key words: Biofilm; Medical implant; Bacterial inhibition therapy

Chinese Library Classification(CLC): R318;R117 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)11-2150-04

前言

医用植入材料广泛渗入到医学和生命科学的各个部门,对人类的健康生活有着非常重大的意义。我国作为世界上人口最多的国家,对医用植入材料的需求之大显而易见。然而随着近年来医用植入材料的应用,也暴露出植入材料感染导致的各种负面影响,给患者增加了很大的身体痛苦和财产负担。医用材料的安全性直接受到微生物形成的生物被膜的影响。当细菌以生物被膜形式存在时,其对抗生素的抵抗力以及各种环境因素的适应能力都有极大的提高。目前生物被膜的形成和降解机制仍是研究的热点,对生物被膜有影响的因素也非常多,并因菌种、培养条件、环境条件、材料性质等的不同而有不同的表现。

因此,在目前医用植入材料的基础上附加抗生物被膜手段,既是提高材料安全性的必经之路,也是一项需要综合考虑,极为复杂的系统工程。

1 医用植入材料的发展趋势

医用植入材料是指那些被固定或埋藏于宿主病变部位,起到替代、修复或支持作用的消耗性材料^[1]。医用植入材料主要包括人工关节、人工血管、心脏支架、人造骨、牙齿材料等各类人工器官,代血浆、人工红血球等血液替代品,透析膜等分离净化用膜材料,输液管、导尿管等经皮穿刺器件等。要保证植入材料成功应用于人体,必需保证以下几点:1)植入物需要与周围的组织有良好的生物相容性;2)安全、感染率低;3)效果持久、价

* 基金项目:天津市科技支撑计划重点项目(11ZCKFSY08200)

作者简介:马群(1985-),女,博士,助理研究员,主要研究方向:微生物生物被膜的抑制机制、抑菌产品设计, E-mail: qun.ma328@gmail.com

(收稿日期:2014-10-17 接受日期:2014-11-12)

格便宜。这几个标准中,材料的安全性不但直接影响到治疗效果的好坏和治疗成本的高低,很多情况下甚至关乎生死。因而,改进材料性能,进而降低细菌感染几率,一直是植入材料改进的重点努力方向。

医用材料植入人体后会发生异物侵入导致的机体免疫力下降。例如正常情况下不会引发感染的非致病性表皮葡萄球菌,在医用材料植入感染中很常见;皮下缝合线使用时引发感染的金黄色葡萄球菌数目为 200 个,而正常情况下该数字为 106^[2]。医学上将这种由于材料植入引发的细菌感染称为“生物材料相关的感染”(Biomaterial-centered infection, BCI)。在美国,每年约有 85 万例此类感染发生,占医院内感染的 45%,其死亡率更是高达 5-60%。在我国,每年约有 400 万人发生导管植入相关型感染,为此额外花费的医疗费用高达 100-150 亿人民币。这些数据进一步说明了提高植入材料抗菌能力的重要性。

金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌是内植物相关感染主要的致病菌,金黄色葡萄球菌通常引起金属生物材料、骨关节、软组织的感染,而表皮葡萄球菌主要引起聚合物材料的感染。其次是大肠杆菌和绿脓假单胞杆菌等主要存在于肠道和尿道的革兰氏阴性菌,以及口腔中的链球菌和呼吸道中的肺炎球菌。此外,除了空气来源的细菌之外,宿主自身的细菌也是感染的主要来源,而且由于宿主对其中的微生物可能已经适应,这些被宿主免疫系统忽略的微生物更加容易在血液中存活,进而导致它们有更大的可能性来感染植入的材料。

2 生物被膜带来的抗菌新挑战

微生物的生物被膜主要指的是与液体接触的固体表面上形成的细菌聚集体(图 1)。在生物被膜中,细菌被自身产生的多糖、胞外蛋白质、胞外 DNA 等体外基质包裹,通过 N-酰基高丝氨酸内酯(AHL)、自诱导分子 2(AI-2)以及吲哚等信号分子进行细胞间的相互协调,形成一定的立体结构,并表现出极强的抗药性(对抗生素耐药性比浮游状态的细菌高出 1000 倍)以及抵抗环境压力(例如营养匮乏、温度波动等)的能力。只要有水存在,无论是极热、极寒,还是强酸、强碱的环境,生物被膜都能够出现并迅速扩张。生物被膜极大的提高了细菌的环境适

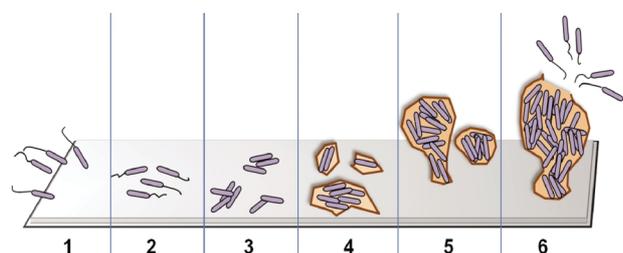


图 1 生物被膜的形成过程。生物被膜的发展经历六个阶段,包括:1)细菌在材料表面的可逆附着;2)细菌在材料表面的不可逆附着;3)细菌形成小的聚集体;4)细菌分泌胞外基质形成初始形态的生物被膜;5)成熟生物被膜;6)生物被膜分解,部分细菌恢复成为游离态细菌

Fig. 1 Biofilm development. Biofilm development includes 6 stages, including 1) The bacterial reversible attachment on the material surface, 2) the bacterial irreversible attachment on the material surface, 3) the formation of small aggregates, 4) the formation of small biofilm with extracellular matrix, 5) the formation of matured biofilm, 6) the dispersal of biofilm and the release of planktonic cells

应能力,在工业生产、日常生活、以及医药卫生等方面都造成了许多难以解决的问题。因而,对生物被膜形成机理的研究一直是微生物界研究的热点和难点。

生物被膜的形成首先受到细菌表面结构的影响。和生物被膜相关的细胞表面结构包括鞭毛、菌毛、膜蛋白等。鞭毛(flagella)、菌毛(type I pili)都是生物被膜形成必不可少的结构^[3]。Curli 菌毛也有促进生物被膜形成的作用,其机理是作为细胞间的粘附因子促进细胞间以及细胞和固体表面间的相互作用^[4]。抗原 43 作为一种膜蛋白,也起到促进生物被膜形成的作用^[5]。大肠杆菌表面重要的膜蛋白 OmpA(单细胞中该蛋白的拷贝数为 ~100000)可以通过影响胞外纤维素的合成而影响到细菌表面的疏水性,进而影响生物被膜的形成^[6]。此外,胞外分泌的多糖^[7]以及 DNA^[8]等都可以影响到细菌生物被膜的形成。

除细菌表面结构之外,生物被膜作为细菌群体行为的一种表现,也受到控制此类群体行为的群体感应信号分子(Quorum sensing signaling molecule)影响。迄今为止最重要的信号分子有酰基高丝氨酸内酯 AHL,自诱导剂 AI-2,以及吲哚等。AHL 是革兰氏阴性菌中常见的信号分子,大肠杆菌体系中的研究表明,虽然大肠杆菌本身无法合成及分泌 AHL,外源的 AHL 依然能够被大肠杆菌感知,并能抑制其生物被膜的形成^[9];吲哚以及它的衍生物 7-羟基吲哚也都对大肠杆菌以及绿脓杆菌等革兰氏阴性菌有显著的抑制作用^[10];而与之相反,AI-2 能够促进革兰氏阴性菌以及革兰氏阳性菌中生物被膜的形成^[11]。此外也有研究认为尿嘧啶是可以促进绿脓杆菌生物被膜形成的信号分子,它的类似物 5-氟尿嘧啶则可以有效抑制生物被膜^[12]。在奇异变形杆菌中,腐胺也被认为具有信号传导分子的特质^[13]。这些信号分子的一大共性就是,都能够在极低的浓度范围内对生物被膜的形成产生关键作用。这些信号分子及其各类衍生物,都极有希望被进一步利用以达到控制微生物被膜形成的目的。生物被膜的形成对植入材料的功能和安全性带来了极大的挑战。其耐药性和环境适应能力使其极难被去除,不但会引发感染,而且还会由于细菌附着影响植入物的正常功能。例如生物被膜会影响人造发生装置中瓣膜的正常活动,甚至会引引起食物渗漏到气管;而对于静脉留置导管而言,生物被膜会导致导管的堵塞,并经常引起菌血症,进而导致脓毒症和心内膜炎等。

3 抗生物被膜方法在抑菌材料发展上的应用

BCI 的治疗极为困难,由于对生物被膜起作用的抗生素浓度要远远高于对抗游离态细菌所需的浓度,因而抗生素对生物被膜的作用微乎其微。最常见的方法就是去除植入物并在植入部位加入缓释抗生素的装置。等植入部位在人体免疫系统和抗生素的共同作用下恢复正常之后,再植入新的无菌植入物。对外科植入物而言,被感染植入物的去除和新植入物的加入要相隔 6 个月。而对于循环系统中存在的植入物而言,去除植入物是非常危险的,有高致死率。有一些物理手段的使用使生物被膜对抗生素的作用更为敏感,如超声波可以推动抗生素向生物被膜内微生物扩散,施加电场也会有加强抗生素效果的作用。这些手段虽然各有应用的局限性,但是依然对未来 BCI 治疗的发展方向有一定的代表性。

与上述手段相比,最直接的对抗生物被膜的方法依然是不断提高材料特性,增强其抑菌性能。根据生物被膜构成及其形成机理等设计不同的方案进行材料表面的改性,以期获得有更

强抑菌或抑生物被膜能力、不会激发微生物耐药性、有更长使用周期的材料。

材料改性的方法有很多种,其核心思想就是通过改变植入材料表面的物化性质而改变微生物在材料表面附着的能力。例如在疏水性极强的表面,微生物就很难附着;同样带负电荷的表面也更难以附着微生物。白蛋白和肝磷脂的涂层也会降低微生物在材料表面的附着能力。从认识到植入材料安全性的重要地位开始,国内外的科研工作者对植入材料的改性做了很多努力。其制作材质可已经包括高分子材料(硅胶等聚合物)、金属材料(不锈钢、钛合金、银锌合金等各种合金制品)、无机非金属材料(羟基磷灰石等)、以及天然生物材料(牛心包制成人工心瓣膜)等各类材料^[1]。

随着近些年生物被膜组成及形成机理的逐步揭示,人们关注的热点集中到材料涂层上。材料涂层按照其抑菌物质划分,主要包括缓释抗生素类涂层、金属离子类涂层、和酶涂层等。按照其对抗生物被膜的机理划分,则主要可分为抑制细菌在材料表面附着的涂层和促进已成型生物被膜分解的涂层。

缓释抗生素类涂层:缓释抗生素类涂层是最直接的材料表面改性方法。由于生物被膜形成的第一步即是微生物在材料表面的附着,如果将材料表面的抗生素浓度维持在一个较高水平,可以避免微生物在材料表面的附着。最常见的方法是将抗菌物质固定到材料表面,做成缓释抗生素的材料。

缓释抗生素类涂层的尝试比较多,最普通的方法是将涂层聚合物用抗生素浸渍,在使用过程中抗生素会扩散到材料周围,形成一定浓度。在此基础上有学者进一步将抗生素和可降解材料共混,则抗生素会随着材料的降解过程逐步释放,较之传统的浸渍法会有更长的作用周期。例如赵长虹等^[14]将万古霉素加入可降解聚乳酸溶剂体系中,并通过溶剂浇铸在医用钛合金表面形成载有万古霉素的聚乳酸涂层,通过改变万古霉素和聚乳酸的质量比来控制万古霉素的释放速率,在钛合金表面维持一定的抗生素浓度。Dave 等^[15]将硫酸庆大霉素和可降解聚己内酯的脂肪酶共同用于聚己内酯涂层,通过控制脂肪酶的用量,可以调节聚己内酯降解以及缓释庆大霉素的速率。体外实验证明这种涂层可以维持至少 60 小时的庆大霉素缓释。其缺陷是往往只能持续几天至几周,周期很短,释放出的抗生素也只能达到载入量的 15%。尤其需要注意的是,这种方法会使细菌和高浓度抗生素直接接触,容易导致耐药性更强微生物的出现。

金属离子类涂层:抗菌效果良好的金属离子首推银离子。银离子抗菌谱广,对易引起尿道炎的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等数十种致病微生物有抑制和杀灭作用。在家用电器方面,银离子抗菌冰箱已经得到了推广和应用。而在医用材料方面,纳米银将纳米二氧化硅作为抗菌剂的载体可制备出载银纳米二氧化硅抗菌剂,并将其用硅烷偶联剂 KH-550 处理,采用紫外光辐射法对其进行表面活化,并在表面接枝抗菌剂,可得到不易脱落的负电荷纳米抗菌包覆层^[16]。银离子对生物被膜的抑制机制和抗生素类似,都是控制初始阶段微生物在材料上的附着过程,在成熟的生物被膜形成后这种作用就减弱许多。这种方法相较抗生素法的优势在于银离子的使用不会催生耐药性提高的细菌。

氧化剂类涂层:日常生活中,氧化剂也常被用于消毒杀菌。Wood 等^[17]将酞菁铜和酞菁钴催化剂结合到树脂中,这些催化

剂可以促进过氧化氢和过硫酸盐为底物的活性氧的生成,将含有催化剂的树脂表面用较低浓度过硫酸氢钾或者双氧水处理时,释放出的活性氧即可起到杀死生物被膜中微生物的作用。由于氧化剂对人体细胞也会造成伤害,这种方法的研究并不多见,应用性也不强。但是由于活性氧的渗透性好,这种方法对已成型的生物被膜可能会有分解的效果。

群体感应淬灭(Quorum quenching)分子涂层:生物被膜作为细胞群集运动的一种体现,受到多种群体感应相关的信号分子的调控,如本文前面提到的 AHL、AI-2、吡啶等。相应的,破坏这种群集运动的信号分子同样存在,如 NO。Dave 等人设计了一种可以缓释 NO 的水凝胶敷料^[18]。其具体方法是将棉纱布和柠檬酸交联反应,随后将多糖明胶涂敷到棉纱布表面,经灭菌及冻干等步骤之后,将水凝胶浸泡于亚硝酸钠溶液中获得成品。这种敷料对普通游离态的微生物和生物被膜中存在的微生物均有抑制作用,并可以多次使用。37 °C 储存 3 个月对其抑菌效果无损失。这种涂层的优势在于可以对成型的生物被膜起作用并促使其快速分散分解,释放出游离态细菌,如果辅以低浓度抗生素治疗,可达到较完全的杀菌效果。

酶涂层:随着生物被膜机理研究的深入,我们也可以根据生物被膜中细菌粘着基质的成分来选择设计一些酶,利用其去除生物被膜。Ghanwate 等^[19]进行了在导尿管表面涂敷酶/庆大霉素/EDTA 的研究,将导尿管浸泡到 1% 的淀粉酶、蛋白酶、溶菌酶、庆大霉素、EDTA 中保持 24 小时,这样获得的表面有涂层的导尿管被用于比较铜绿假单胞菌在其表面形成生物被膜(尿液体系下)的可能性,结果表明上述几种酶和抗生素、EDTA 等均对生物被膜有抑制作用,其中蛋白酶的作用最为明显。如果采用固定化酶技术将其固定到植入材料的表面,则会获得分解生物被膜粘着基质,加速生物被膜分解的效果。

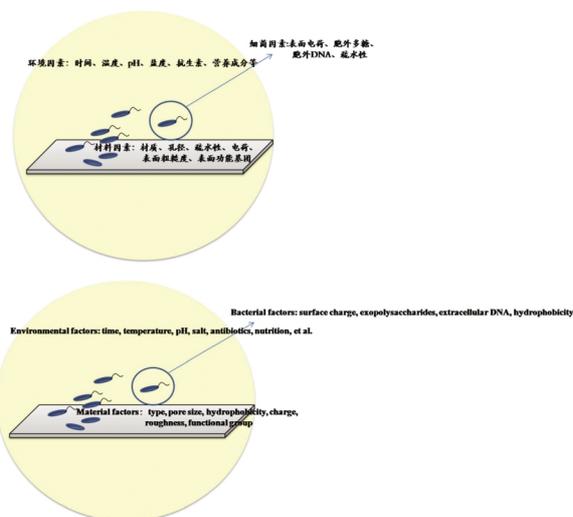
其它抑菌涂层:除上述根据抑菌机理设计的涂层外,也有学者通过筛选的方法获得可以显著降低细菌附着的材料涂层。例如 Hook 等通过一种高通量筛选方法检测了微生物在几百种聚合材料表面附着情况^[20],并发现一组含有酯和环状烃配基的结构类似物显著降低了铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等致病菌的附着。在硅胶表面涂敷此类结构的物质之后,微生物的附着情况比商用的银离子水凝胶要低 30 倍。

4 展望

生物被膜的形成受到多种因素的影响(图 2),包括环境因素、细菌本身的因素、材料性质的因素等。要达到控制生物被膜的目的,就必须了解这些因素对生物被膜形成的影响程度和相互关系。目前国内外对生物被膜形成机理的研究主要集中在微生物本身群集行为的机制分析上,很多学者致力于寻找有“牵一发而动全身”功能的群体感应信号分子及群体感应淬灭信号分子,以期找到控制生物被膜的钥匙。本文前面提到过的 AI-2、AHL、吡啶、NO 等小分子均被作为群体感应信号分子进行过深入详细的研究,但是这些信号分子的影响范围始终局限在特定的菌种,而医学上常见的感染多数情况下不止含有一种细菌,所以迄今为止群体感应信号分子的可应用性依然不高。未来随着该领域成果的不断更新,有希望发现更广谱的信号分子,或者揭示已知信号分子的作用规律,则我们可以设计可以带有可降解重要群体感应信号分子的酶或其他物质的材料涂层。

另外,生物被膜中用于“粘附”细菌的胞外多糖、胞外蛋白质、以及胞外 DNA 等都被证实会极大的影响生物被膜的发展。因而可以对胞外的粘附基质进行进一步分析,结合材料本身的特性找出起作用的物质,选择可降解该物质的酶用于材料表面的涂层,也可以达到降解生物被膜的目的。

总之,生物被膜给医用材料植入带来了极大的感染风险,抗生素、抑菌金属离子、氧化剂、群体感应淬灭分子、酶等都被尝试应用于降低材料表面生物被膜形成的可能。未来生物被膜形成机理的更深入了解将是今后对医用材料改性和加工的推动力量。当然,除细菌感染带来的安全性需求外,影响医用植入材料效果的还有其生物相容性等特性,这都是材料改性所需要满足的必要条件。



(英文对照)

图 2 影响生物被膜形成的因素

Fig. 2 Factors that influence biofilm formation

参考文献(References)

[1] 王莉莎, 罗艳丽. 医用植入物材料与宿主相互作用及生物安全性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(49): 9755-9758
Wang Li-sha, Luo Yan-li. Biosafety and interactions between medical implants and host [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(49): 9755-9758

[2] Elek SD, Conen TA. The virulence of Staphylococcus pyogens for man: study of the problems of wound infection [J]. Br J Exp Pathol, 1957, 38(6):573-577

[3] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili [J]. Mol Microbiol, 1958, 30(2): 285-293

[4] Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, et al. Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression [J]. J Bacteriol, 1998, 180(9): 2442-2449

[5] Danese PN, Pratt LA, Dove SL, 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] Ma Q, Wood TK. OmpA influences Escherichia coli biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system[J]. Environ Microbiol, 2009, 11(10):2735-2746

[7] Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework [J]. Microbiology, 2001, 147:3-9

[8] Ueda A, Wood TK. Tyrosine Phosphatase TpbA of Pseudomonas aeruginosa Controls Extracellular DNA via Cyclic Diguanylic Acid Concentrations [J]. Environ Microbiol, 2010, 2(3): 449-455

[9] Lee J, Jayaraman A, Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA [J]. BMC Microbiol, 2007, 7: 42

[10] Lee J, Attala C, Cirillo SL, et al. Indole and 7-hydroxyindole diminish Pseudomonas aeruginosa virulence [J]. Microbial Biotechnol, 2009, 2 (1): 75-90

[11] Gonzalez Barrios AF, Zuo R, Hashimoto Y, et al. Autoinducer 2 controls biofilm formation in Escherichia coli through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022) [J]. J Bacteriol, 2006, 188(1): 305-316

[12] Ueda A, Attala C, Whiteley M, et al. Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa and fluorouracil is an antagonist [J]. Microbial Biotechnol, 2009, 2(1): 62-74

[13] Ma Q, Fonseca A, Liu W, et al. Proteus mirabilis interkingdom swarming signals attract blow flies [J]. The ISME Journal, 2012, 6(7): 1356-1366

[14] 赵长虹. 医用钛合金表面抗菌涂层的制备及其抑菌性能研究 [D]. 重庆:重庆大学, 2009
Zhao Chang-hong. Preparation and Bacterial Inhibition Study of Antimicrobial Coating on the Surface of Biomedical Titanium Alloy [D]. Chongqing:Chongqing University, 2009

[15] Dave RN, Joshi HM, Venugopalan VP. Novel Biocatalytic Polymer-Based Antimicrobial Coatings as Potential Ureteral Biomaterial: Preparation and In Vitro Performance Evaluation [J]. Antimicrob Agents Ch, 2011, 55(2): 845-853

[16] 陈春华, 魏丽乔, 贾鹏, 等. 医用导尿管的表面抗菌改性研究 [J]. 功能材料, 2007, 38: 1826-1827
Chen Chun-hua, Wei Li-qiao, Jia Peng, et al. Study on superficial antibacterial modification of catheter [J]. Journal of Functional Materials, 2007, 38: 1826-1827

[17] Wood P, Jones M, Bhakoo M, et al. A novel strategy for control of microbial biofilms through generation of biocide at the biofilm-surface interface [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(7): 2598-2602

[18] Dave RN, Joshi HM, Venugopalan VP. Biomedical evaluation of a novel nitrogen oxides releasing wound dressing [J]. J Mater Sci Mater Med, 2012, 23(12): 3097-3106

[19] Ghanwate NA, Thakare PV, Bhise PR, et al. Prevention of biofilm formation in urinary catheter by coating enzymes/gentamycin/EDTA [J]. World Academy of Science, Eng and Technol, 2012, (70): 487-489

[20] Hook AL, Chang C-Y, Yang J, et al. Combinational discovery of polymers resistant to bacterial attachment [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30:868-875