

红霉素对绿脓杆菌生物膜形成的抑制作用^①

饶 宪^② 唐英春 张扣兴 张天托 毕小刚

(中山医科大学附属第三医院内科; 广州, 510630)

摘 要 采用高效液相色谱分析的方法, 测定不同浓度红霉素在琼脂培养基上生长的绿脓杆菌产生的藻酸盐。结果显示: 红霉素对绿脓杆菌产生藻酸盐物质有抑制作用, 红霉素的浓度在 1 mg/L、4 mg/L、16 mg/L 和 64 mg/L 时, 抑制率分别为 23.7%、65.2%、92.0% 和 92.5%。电子扫描显微镜观察, 红霉素浓度为 50 mg/L 时, 放在其溶液中的医用塑料纤维片上, 未见绿脓杆菌生物膜的形成。红霉素是通过抑制绿脓杆菌产生藻酸盐进而抑制其生物膜的形成。

主题词 红霉素/治疗应用; 红霉素/药理学; 假单胞菌, 铜绿/药物作用; 生物膜; 藻酸盐

中图分类号 R 978.1; 378.99

一些细菌形成生物膜是造成慢性感染治疗困难的原因之一, 细菌因长期生存的需要, 在感染灶局部, 或体内留置物的表面附着后, 产生多糖-蛋白质复合物, 互相牢固地凝集在一起, 形成所谓的生物膜, 它有助于细菌抵抗外界的攻击, 在一定的条件下, 又游离出来, 形成新的感染灶, 反复感染, 造成感染慢性化, 更为难治。绿脓杆菌是慢性呼吸道感染中常见病原菌之一, 其中粘液型绿脓杆菌形成生物膜, 它产生的多糖-蛋白质复合物的主要成分为藻酸盐^[1], 作者就红霉素对绿脓杆菌产生藻酸盐的影响进行了研究, 并用电子扫描显微镜观察绿脓杆菌生物膜的形成。

1 材料和方法

1.1 藻酸盐定量分析

1.1.1 藻酸盐的分离提取 将粘液型绿脓杆菌标准菌株 M310 接种在对照组及含 1~64 mg/L 不同浓度红霉素(大日本制药株式会社提供)的普通琼脂培养基, 37℃ 培养 24 h。收集菌落用生理盐水调制菌液浓度为 McFarland No. 4。取部分菌液稀释后用 Spiral system 接种于普通琼脂培养基, 37℃ 过夜培养, 进行存活菌落计数。菌液用 0.22 μm 微小过滤器过滤灭菌, 取 1 mL 滤液按照丰田氏的改良法^[2,3] 进行藻酸盐分离提取, 取 20 μL 用高效液相色谱分析(HPLC)方法作藻酸盐的定量, 浓度用标准曲线法求得。

1.1.2 标准曲线配制 配制含标准藻酸盐(sigma 产品)5 mg/L 至 200 mg/L 不同浓度的溶液, 按上法同条件下提取测定。求得值制成标准曲线。标准曲线方程由标准藻酸盐的浓度对藻酸盐与外标峰面积比值求得。

1.1.3 HPLC 的测定条件 高效液相色谱仪为日本岛津公司生产的 LC-9A 型系列, 检出器同为岛津公司的 SPD-6AV 型分光光度计。色谱柱为日本分光公司制造的 Finepak SI LC18 长 25 cm, 内径 4.6 mm; 移动相是氰化甲烷-水-醋酸丁脂(75:20:5); 流速为 1.2 mL/min, 紫外线检测波长为 565 nm。

1.2 电子扫描显微镜观察生物膜

试管内生物膜制作根据小林氏的方法^[4] 稍作改良。绿脓杆菌 M310 接种于普通琼脂培养基, 37℃ 培养约 16 h, 用生理盐水调制菌浓度约为 5×10^9 CFU/L。红霉素浓度为 0.5 mg/L、50 mg/L, 放入 5 mm×5 mm 医用塑料纤维片, 37℃ 培养 1 周, 用 2.5% 戊二醛和 1% 四氧化钨酸双重固定, 在 60.0%~99.5% 乙醇系列内脱水、临界点干燥后, 白金蒸着, 用日立 S-450 电子扫描显微镜进行观察。

1.3 红霉素最低抑菌浓度(MIC)测定

用二倍稀释方法配制含不同浓度红霉素的 MHA 培养基(Mueller-Hinton agar), 接种物为每点 10^4 CFU 绿脓杆菌 M310, 37℃ 培养 24 h, 观察结果。

① 卫生部启动基金(A168)资助项目; ② 第一作者, 1956 年出生, 男, 讲师

1.4 统计学处理

藻酸盐测定数据用 $\bar{x} \pm s$, $n = 5$ 实验组的各数据采用与对照组配对, 以 t 检验法进行检验。 $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结 果

2.1 藻酸盐测定

藻酸盐在本实验条件下分离良好, 分离保留时间在 4 min, 最低检测浓度为 1.25 mg/L, 在 200 mg/L 浓度范围内线性关系良好, $r = 0.999$, 平均回收率 97.18%, 日内误差与日间误差的变异系数均小于 5%。表 1, 为标准藻酸盐的回收率及精密度测定结果。

表 1 藻酸盐的回收率及精密度测定 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

投入量	测得平均量	回收率 ¹⁾ (%)	日内测得平均量	CV (%)	日间测得平均量	CV (%)
12.50	12.05	96.40	12.05±0.49	4.06	12.45±0.45	3.60
25.00	23.17	92.68	23.17±0.29	1.26	23.15±0.31	1.34
50.00	48.41	96.82	48.41±0.32	0.66	48.43±0.60	1.24
100.00	101.00	101.00	101.00±1.76	1.74	102.45±2.27	2.22
200.00	197.97	98.99	197.97±1.91	0.96	199.09±2.88	1.45

1) 平均回收率(97.18%±3.12%); 变异系数(cv)=3.21%

2.2 红霉素对绿脓杆菌产生藻酸盐的影响

实验结果表明红霉素对绿脓杆菌 M310 产生藻酸盐有良好的抑制性(表 2)。绿脓杆菌 M310 对红霉素高度耐药, MIC 为 512。

表 2 红霉素对绿脓杆菌 M310 产生藻酸盐的影响

红霉素 (mg/L)	藻酸盐 ¹⁾ (μg , $\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	P 值 ²⁾
—	38.8±6.3		
1	29.6±10.2	23.7	> 0.05
4	13.5±4.1	65.2	< 0.05
16	3.1±1.3	92.0	< 0.001
64	2.9±1.1	92.5	< 0.001

1) 藻酸盐为每毫升含有 1×10^9 cfu 绿脓杆菌产生的量(μg);
2) 表中 P 值均为与不含红霉素的对照组比

2.3 红霉素对绿脓杆菌生物膜形成的影响

图 1 的电镜观察结果可以看到, 对照组(A)绿脓杆菌 M310 菌株体表面产生了许多糖-蛋白质复合物, 互相凝集在一起, 菌体的形态不清楚, 形成了所谓的生物膜。红霉素浓度为 5 mg/L 组(B), 菌体表面的多糖-蛋白质复合物较对照组有所减少, 但仍互相凝集在一起, 形成了生物膜。红霉素浓度在 50 mg/L(C), 医用塑料纤维片表面上的绿脓杆菌菌体光滑, 无多糖-蛋白质复合物产生, 没有形成生物膜, 说明红霉素确实能够抑制绿脓杆菌生物膜的形成。

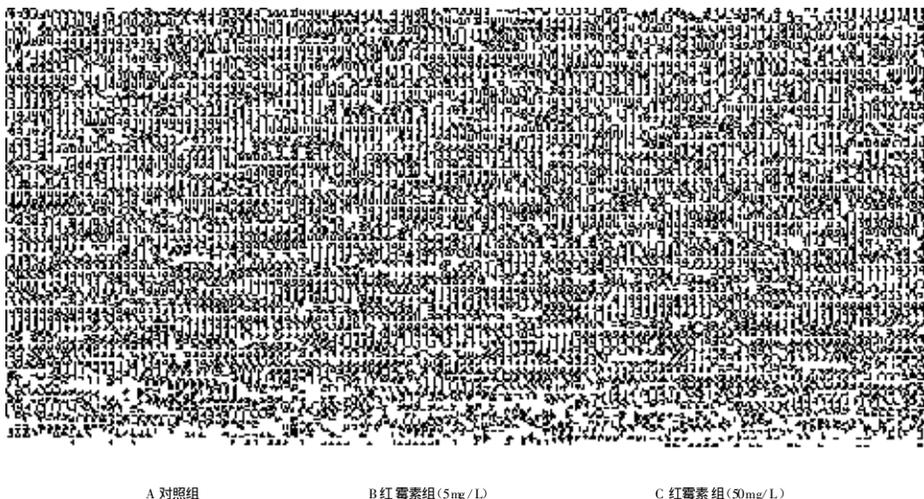


图 1 电子扫描显微镜下不同浓度红霉素抑制绿脓杆菌生物膜的形态(图中线条=5 μ)

3 讨论

肺、下呼吸道的一些基础疾患,如弥漫性泛细支气管炎(diffusepanbronchiolitis)、慢性支气管炎、支气管扩张等容易感染,绿脓杆菌是重要的病原菌之一,绿脓杆菌有粘液型和非粘液型两种类型,非粘液型绿脓杆菌不形成生物膜。绿脓杆菌生物膜的形成与绿脓杆菌的粘液化有关,非粘液型的绿脓杆菌在渗透压较高、氯化钠较多、磷酸盐较少等条件下,容易转化为粘液型,在慢性呼吸道绿脓杆菌感染症,容易分离培养出粘液型绿脓杆菌^[5,6]。粘液型绿脓杆菌产生的多糖-蛋白质复合物由藻酸等构成,美国学者Linker和Jones在1966年首先报道从绿脓杆菌分离出藻酸盐物质^[7]。细菌形成生物膜,产生耐药性,使治疗困难。在慢性呼吸道感染症的治疗和预防上,如何防止细菌生物膜的形成是非常重要的,尤其在慢性绿脓杆菌感染症,如何防止绿脓杆菌的粘液化,抑制生物膜形成中的重要物质藻酸盐的产生,在这方面国外已进行了较广泛的研究,已有报告,采用实验室试管法用14环的大环内脂类药物,联合应用环丙沙星、氧氟沙星等喹诺酮类药物,对绿脓杆菌生物膜进行研究^[8]。

红霉素对绿脓杆菌无杀菌或抑菌作用,因而理论上单用红霉素对绿脓杆菌感染症无治疗效果。我们的研究表明红霉素能够抑制绿脓杆菌生物膜的形成,能够抑制粘液型绿脓杆菌产生藻酸盐,抑制粘液的产生。红霉素抑制藻酸盐产生的机理,可能在于抑制了藻酸盐形成过程中的酶GMD的活性^[9]。由于红霉素能够抑制绿脓杆菌生物膜的形成,从而提高了敏感抗生素对慢性绿脓杆菌感染症的治疗效果。在日本实际上也在临床上将红霉素等14环的大环内脂类药物用于弥漫性泛细支气管炎

等慢性气道感染症的治疗,也提高了弥漫性泛细支气管炎患者的5年生存率^[10]。鉴于红霉素对绿脓杆菌生物膜的抑制作用,它对防治慢性绿脓杆菌感染症有一定的临床意义。

(本研究得到日本国琉球大学医学部第一内科斋藤厚教授的指导和赞助,特此致谢)

参 考 文 献

- 1 一宫朋来,山崎透,那须胜.内科领域によboifilm感染症.化学疗法の領域,1994,10(8):1510
- 2 丰田正武,四方田千佳子,伊藤誉志男,ほか.高速液体クロマトグラフィー—によたるとる食品中のアルギン酸ナトリウムの分析法.食卫誌,1985,26(2):189
- 3 Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, et al. Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37(9): 1749
- 4 小林宏行. *Pseudomonas aeruginosa*と组织付着.呼吸,1992,11(5):568
- 5 大垣宪隆,太田见宏,小林宏行.细菌感染症—最新の化学療法.临床と微生物,1994,21(1):51
- 6 James M T, Sophia E P, Stephen J M. Environmental condition which influence mucoid conversion in *pseudomonas aeruginosa* PA01. Infect Immun, 1991, 59(2):471
- 7 Linker A, Jones R S. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *pseudomonas*. J Biol Chem, 1966, 241(12):3845
- 8 大垣宪隆. Bacterial biofilm in chronic airway infection. 感染症雑誌, 1994 68(1):138
- 9 小林宏行. 绿脓菌气道感染症とマクロライド.日胸, 1995, 54(4):267
- 10 工藤翔二, 吾妻安良太. 14 环マクロライド剂长期疗法の理论与课题. 化学疗法の領域, 1994, 10(7):1259

(1996-11-20 收稿 1997-05-15 修回)

THE EFFECT OF ERYTHROMYCIN ON BIOFILM FORMATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Rao Xian Tang Yingchun Zhang Kouxing Zhang Tiantuo Bi Xiaogang

(Department of Internal Medicine, the Third Affiliated Hospital
Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou, 510630)

Alginate produced by *P. aeruginosa* which were incubated at culture media contained different concentration of erythromycin (EM) was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) method. The results showed that alginate production by *P. aeruginosa* was inhibited by EM. Inhibiting rates of EM at 1 mg/L, 4 mg/L, 16 mg/L and 64 mg/L were 23.7%, 65.2%, 92.0% and 92.5%. The results from scanning electron microscopy showed no biofilm formation of *P. aeruginosa* on teflon piece in EM solution (50 mg/L). This study demonstrated that the biofilm of *P. aeruginosa* could be inhibited by EM through inhibited alginate production.

Subject headings erythromycin/ therapeutic use; erythromycin/ pharmacology; pseudomonas aeruginosa/ drug effects; biofilm; alginates

。简 讯。

我国生存质量的测定和评价引起国际关注

人类与健康有关的生存质量的测定与应用是目前世界医学界关注的热点之一。随着疾病病谱、健康概念和医学模式的转变,我国医疗卫生工作者开始重视生存质量的评价,但缺乏适宜的手段、限于文化、语言和国情差异,国外量表翻译成中文是否适用?各家自行修改和增删国外量表,缺乏可比性和权威性。因而,我国急需一套既有国际可比性,又适合中国文化、语言和国情的标准化量表。

中山医科大学和广东省卫生厅率先合作研究 WHOQOL-100 中国广东版。卫生部也及时地领导开展全国性协作研究。去年5月在卫生部领导下成立了由中山医科大学牵头,有上海医科大学、西安医科大学、中国医科大学、华西医科大学、北京老年医学研究所和协和医院等单位参加组成的“世界卫生组织生存质量量表中国版”协作研究组。经过1年努力,研制了普适性量表 WHOQOL-100 中文版并经过大规模现场测试,又研制了适用于肝癌患者、糖尿病患者和戒毒者3种特异性量表以及系统整理出改进生存质量资料统计分析的方法。

1997年4月10日在香港举行的第2届生存质量学术会议上,由卫生部领导的生存质量研究中国中心负责人方积乾教授应邀报告了该项成果,当宣布目前的中国中心的学术水平和地位已和国际上早期的15个中心并驾齐驱时,全场响起了热烈的掌声。在会议组织的专题研讨会上V型?专家就医药卫生工作普及推广生存质量测定和研制特异性模块的必要性与方法学展开了深入讨论。香港医院管理局负责人专程约请世界卫生组织官员奥利博士、中国卫生部官员史安刚、中山医科大学方积乾教授及来自美国、加拿大和澳大利亚的学者座谈,并征询如何在香港医院管理改革中应用生存质量的测定与评价,从而进一步推进“以病人为中心”的医院管理工作。

(冯世容)