

• 综 述 •

关节假体感染细菌生物膜的研究进展*

杨培丽^{1,2}, 王丽娟^{1,2}, 王奕翔^{1,2} 综述, 王勇平^{1△} 审校

(1. 兰州大学第一医院骨科, 兰州 730000; 2. 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000)

摘 要:细菌生物膜(BBF)是细菌分泌的多糖、纤维蛋白和脂蛋白等物质黏附于生物材料形成的并能将细菌自身包裹于其中的膜样复合物,如关节假体表面的膜状物质。BBF 能增强细菌对外界刺激的耐受力及抗菌药物的耐药性。近年来,BBF 对抗菌药物极强的抵抗力成为临床上难治性感染的重要原因之一。随着人工关节置换术的广泛应用,关节假体感染后 BBF 的研究发展迅速。本文就关节假体感染后 BBF 的研究进展进行综述,主要包括 BBF 的形成过程、耐药机制、检测方法以及防治方法。

关键词:关节置换; 细菌生物膜; 耐药机制; 检测技术; 防治方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.09.026

中图法分类号:R687.32

文章编号:1673-4130(2018)09-1113-04

文献标识码:A

人工关节置换术已作为一种成熟的治疗措施,主要用于治疗晚期关节疾患,以减轻关节疾患给患者带来的痛苦,并重建关节功能^[1],而关节术后感染是一种严重的并发症,其反复发作和难以控制的主要原因就是细菌生物膜(BBF)的形成^[2]。

BBF 是指浮游的细菌为了适应新的生存环境,在一系列信号分子的介导下黏附于生物材料(如关节假体表面)或者正常组织表面,被细胞胞体产生的多聚物包裹从而形成的具有组织结构的细菌群体^[3]。最新研究表明,DNA 也是生物膜的一个重要成分,其中水分含量可高达 97%,除了水和细菌外,生物膜中还含有蛋白质、多糖、肽聚等物质^[4]。

1 关节假体表面 BBF 的结构及特点

BBF 由 2 个主要部分组成:一是细菌为了生存而附着于关节假体表面,以此作为生长的基床;二是细菌为了适应环境,分泌大量胞外蛋白、蛋白质、DNA、RNA 等,这些物质组成的胞外聚合物(EPS)增强了细菌对外界刺激及抗菌药物的耐受性,因此 BBF 比单纯的细菌菌落更难以清除,是目前假体感染难以治愈的重要原因之一。BBF 的主要特点有移动性、异质性、抗吞噬性、耐药性、黏附性、胞间信号转导、分裂缓慢、细菌分布规律性。

2 BBF 与关节假体感染

人工关节置换术已取得极大的进步,近年来发展尤其迅速,全世界每年有 100 万至 200 万例,据统计,美国每年的髋、膝关节置换手术可达 70 万例之多^[5]。而人工关节术后假体感染,仍是关节外科中有待解决的难题。人工关节术后一旦感染,其很难单纯依靠抗菌药物奏效的一个重要原因是关节假体表面 BBF 的形成^[6]。

3 BBF 的形成机制

有研究发现,BBF 的形成过程受外界环境(如营养成分、pH 值、温度、渗透压、水流冲刷力、介质的表面特性等^[7])以及菌体自身(如膜表面特性、凝固酶的有无、染色体的倍性等)条件的影响^[8],BBF 的形成包括细菌定植与附着、细菌与细胞之间的吸附与增殖、生物膜的成熟及最后细菌的脱离 4 个阶段^[9]。

3.1 细菌定植与黏附 因环境中的黏附分子与细菌之间存在高度的亲和力,当游离细菌接触到环境中的黏附因子时其可介导菌体与生物材料、菌体与菌体间的黏附与聚集。此时细菌通过鞭毛或纤毛等附着结构黏附于关节假体表面。由于此阶段缺少成熟 BBF 结构的保护,细菌的抗药性很弱,因此此阶段抗菌药物的治疗效果较好。

3.2 细菌吸附与增殖(又称菌体的发展) 细菌的发展是指已固着于关节假体表面的菌体大量生长繁殖,同时分泌大量胞外多糖,其中 EPS 的大量表达是细菌附着后最重要的生长变化之一。分泌出的 EPS 可黏结细菌而形成微菌落,大量微菌落使生物膜加厚^[10]。而当细菌繁殖到一定密度后,细菌自身可释放出一些细胞间信号分子,这些信号分子可以参与产生更多的生物膜,这种现象称为细菌的群体感应效应系统(QS),该效应系统是细菌耐药性的重要原因之一。

3.3 生物膜的成熟 在细菌胞间信号系统的调节下,形成的类似蘑菇形状的微菌落大量聚集在一起,形成了组织结构复杂、功能多样的成熟 BBF。细菌在 BBF 成熟过程中,主要通过监测群体的细胞密度来调节其特定基因的表达,以保证 BBF 中营养物质的运输和废物的排出,以避免因细菌过度生长而造成的空间和营养物质缺乏^[11]。

* 基金项目:甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSHY-2015-53)。

△ 通信作者, E-mail: wangyp312@163.com。

本文引用格式:杨培丽,王丽娟,王奕翔,等. 关节假体感染细菌生物膜的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(9): 1113-1116.

3.4 细菌的脱落与再植 成熟 BBF 上的细菌一部分在自然条件下从生物膜上游离出来,另一部分在 BBF 内在的调节机制和外部冲刷力等作用下,从 BBF 中脱落,脱落的细菌以浮游的形式存在,当遇到合适的黏附表面时,又可形成新的 BBF。

4 BBF 的耐药机制

4.1 BBF 的物理屏障及电荷屏障作用(又称渗透限制) EPS 包裹细菌黏附于关节假体表面,形成了 BBF 的物理屏障,这种屏障可以防止抗菌药物嵌入在细菌外壁上^[12]。此外,相关研究表明^[13],BBF 还具有电荷屏障,其胞外多糖带负电荷,能够吸收多肽链中带正电荷的氨基侧链,从而阻碍亲水性的抗菌药物进入菌体发挥杀菌作用,从而使抗菌药物的杀菌能力降低。

4.2 营养限制 BBF 是一种低氧浓度的微环境,细菌生长过程中能够产生大量影响抗菌药物活性的酸性代谢产物。PETERSEN 等^[14]通过比较指数生长期到静止期不同阶段浮游菌和 BBF 菌耐药性的差别,结果发现两者耐药性均随生长速度减慢而增强,且均在静止期表现出的耐药性最高,在相同时期 BBF 细菌耐药性是浮游菌的 15 倍。另一研究同样证实,细菌代谢低,氧浓度低,可参与 BBF 耐药的形成^[15],并且营养的消耗使一些细菌生长缓慢或停止分裂,这类细菌一般对抗菌药物敏感性差。

4.3 BBF 基因表型的改变 BBF 基因表型改变是指浮游细菌聚集、黏附后,为了适应新的生长环境,BBF 特定的基因表达发生变化,使得细菌的生物学行为发生改变^[12]。细菌特有的基因表型能诱导 BBF 的耐药性,钱冠宇^[16]的研究发现,在氟康唑长期作用下耐药性逐渐增强的白念珠菌,检测其基因表型发生了变化。另一研究发现^[17],铜绿假单胞菌 *ndvB* 基因的表达,与胞外多聚糖的形成密切相关,若其 *ndvB* 基因的表达发生了改变,胞外多聚糖的形成就会发生变化,导致抗菌药物远离生物膜外特定的靶细胞,降低抗菌药物的作用,从而增强生物膜的耐药性。

4.4 BBF 的抗菌药物外排泵系统 抗菌药物外排泵系统是细菌自我保护的一种手段,它是指细菌通过产生外排系统将进入细胞生物膜的抗菌药物排出体外。有研究表明^[18],AdeABC、AdeIJK、AdeFGH 主要存在于鲍曼不动杆菌,其中 AdeDE、AdeXYZ 主要存在于不动杆菌属 GDG3 基因型菌株中,它们均可以外排多种抗菌药物,从而引起菌株的广泛耐药。GILLIS 等^[19]也发现 MexCD-OprJ、MexXY 基因是铜绿假单胞菌外排大环内酯类抗菌药物阿齐霉素并产生耐药性的机制。

4.5 QS 系统 QS 系统是指群体中的细菌通过其合成、分泌的信号分子控制整个细菌种属群体的一种行为,当该信号分子达到一定浓度时,通过信号传递调控某些特定基因的表达,从而实现对整个细菌群体适应功能的调节^[20]。陈双红^[21]等的研究显示,QS 系统

在接受环境信号激活后,通过调节铜绿假单胞菌的 300 多个毒力基因,包括:细菌生长、运动、鞭毛形成、分泌系统、生物被膜形成因子等,从而增强细菌的耐药性。铜绿假单胞菌 QS 系统调节效应,与细菌致病和宿主逃避等行为密切相关,一直是临床细菌抗感染研究的热点^[22]。刘晓岚^[23]等的研究显示,铜绿假单胞菌 QS 系统中存在 2 个系统,即 Las I /LasR 和 Rhl I /RhlR,因其在感染过程中调节细菌产生大量胞外黏多糖等形成的生物膜,保护细菌免遭抗菌药物的作用和宿主免疫功能清除,成为临床难治性感染的重要因素之一。

5 BBF 的检测方法

5.1 血清学实验室检查 假体感染的血清学指标主要包括是红细胞沉降率(ESR)、C 反应蛋白(CPR)和白细胞介素 6(IL-6)。CPR 和 ESR 对感染虽然有一定诊断依据,但都是非特异性的炎性指标。IL-6 是假体感染的高预测性指标,研究表明^[24],IL-6 在关节置换术后 6~12 h 达到峰值,在术后 48~72 h 恢复至正常。

5.2 结晶紫染色 结晶紫染色是利用生物膜内的物质能够与染料结晶紫结合的性质,通过染色的方法对细菌的生物膜进行定量检测。这种方法简便快捷,为试管法及 96 孔板法形成的生物膜的常用检测试剂^[12]。

5.3 生物膜的细菌培养 细菌培养曾认为是关节假体感染诊断的金标准,传统的细菌培养却不适用于 BBF 的检测。BBF 的细菌培养则选用超声处理关节假体后的细菌培养,通过延长细菌培养时间或反复细菌培养以提高检测结果的阳性率^[25]。有研究表明^[26],使用超声处理钛和钢 2 种金属表面形成的 BBF 与单纯采用手术刀片刮除金属表面的生物膜相比,前者细菌培养的阳性率大大提高。

5.4 PCR 技术 通过 PCR 技术(包括定量 RT-PCR,基因探针,实时 PCR 等技术),DNA 得以迅速扩增,不仅可进行基因分离、克隆和核酸序列分析等基础研究,还可用于疾病的诊断。有研究表明^[27],PCR 技术检测 BBF 可以缩短等待细菌培养结果的时间。

5.5 荧光原位杂交技术(FISH) 荧光原位杂交技术是指根据已知细菌的 DNA 序列,利用荧光标记的特异寡聚核苷酸片段作为探针,与环境基因组中 DNA 分子杂交,检测该细菌种群的存在。此外,在荧光原位杂交的基础上借助荧光显微镜可检测 BBF 中的菌量、空间形态分布及细菌 DNA^[28],以助于诊断的确定。

6 BBF 的防治

相关研究表明,预防性地使用抗菌药物能减少关节假体置换术后感染的发生。抗菌药物预防的主要目标是使血液和组织药物浓度超过抗菌药物最低有效血药浓度,以防止术中感染,因此抗菌药物的使用

应在术前进行^[29]。

此外,人工关节感染后形成的 BBF 是否能够彻底根治,与能否彻底清除存在于假体表面的 BBF 密切相关。目前,清除关节假体表面的 BBF 的方法主要有物理清除、化学清除、生物清除 3 大类。TRAMPUZ 等^[30]提出通过破坏细菌的黏附和生物膜多细胞结构以减少 BBF 形成的策略,如:通过超声、冲击波、涡旋、电流强度、酶等方法处理,从而破坏细菌的生长。段高飞等^[31]通过物理清除(机械清除、超声波、电击)、天然产物(如北美洲水果酸果蔓果汁中的高分子量原花青素)、金属离子(银离子、铜离子、金属镓等)、表面活性剂、抗体、酶等方法清除 BBF,并取得一定的效果。还有研究提出 BBF 可能的防治策略有以下几点^[32]:(1)探索现有抗菌药物抗 BBF 特性,或者发展新型抗菌药物;(2)发展抗细菌黏附或聚集的生物材料或者定期更换材料;(3)从基因水平上控制 BBF 特异基因的表达等。

7 小 结

综上所述,关节假体表面 BBF 的形成与关节置换术后假体感染密切相关,因此对 BBF 的研究已成为临床假体感染研究的热点。尽管如此,在 BBF 的组成结构、形成机制和维持机制、BBF 与机体免疫关系等方面仍有许多复杂的机制尚不明确,尤其是对 BBF 形成调控有关的关键基因的克隆及表达的研究都有待进一步深入。但人工关节术后感染的预防仍然是至关重要的,只有从源头上消除 BBF,才能彻底消除感染对人工关节的威胁。

参考文献

- [1] 王坤正. 浅谈中国关节置换外科的现状与未来[J]. 中华关节外科杂志(电子版),2015,7(6):703-706.
- [2] 雷欢,魏宇清,方祥,等. 副溶血弧菌生物膜的形成及壳聚糖的抑制作用[J]. 食品与发酵工业,2016,42(10):29-33.
- [3] H? IBY N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections[J]. Pathog Dis, 2014, 70(3):205-211.
- [4] WHITCHURCH C B, TOLKER-NIELSEN T, RAGAS P C, et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation[J]. Science, 2002, 295(5559):1487.
- [5] LOVE C, MARWIN S E, PALESTRO C J. Nuclear medicine and the infected joint replacement[J]. Semin Nucl Med, 2009, 39(1):66-78.
- [6] NISHIMURA S, TSURUMOTO T, YONEKURA A, et al. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases[J]. J Orthop Sci, 2006, 11(1):46-50.
- [7] 王丽英. 生物膜的形成与控制[J]. 食品工业科技, 1998, 20(6):10-12.
- [8] REYNOLDS T B, FINK G R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation[J]. Science, 2001, 291(5505):878-881.

- [9] 周敏, 尤理想, 赵青, 等. 细菌生物膜的形成及耐药机制研究进展[J]. 微生物前沿, 2013, 2(4):98-101.
- [10] 李纪兵, 陆春. 体内生物膜研究进展[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(5):83-87.
- [11] 吴岳嵩, 王志伟, 徐卫东. 细菌生物膜与人工关节感染[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2012, 6(6):74-77.
- [12] 崔海英, 张雪婧, 赵呈婷, 等. 细菌生物膜的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8):11-14.
- [13] 陈铁柱, 李晓声, 曾文魁, 等. 细菌生物膜耐药机制的研究与进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(12):2205-2208.
- [14] PETERSEN F C, PECHARKI D, SCHEIE A A. Biofilm mode of growth of Streptococcus intermedius favored by a competence-stimulating signaling peptide[J]. J Bacteriol, 2004, 186(18):6327-6331.
- [15] WALTERS M C, ROE F, BUGNICOURT A, et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to ciprofloxacin and tobramycin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(1):317-323.
- [16] 钱冠宇. 体内获得性耐药进程中白念珠菌表型和基因表达变化的研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2016.
- [17] BEAUDOIN T, ZHANG LI, HINZ A J, et al. The biofilm-specific antibiotic resistance gene ndvB is important for expression of ethanol oxidation genes in Pseudomonas aeruginosa biofilms[J]. J Bacteriol, 2012, 194(12):3128-3136.
- [18] 杨瑞林, 多丽波. 不动杆菌属 RND 主动外排系统研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(2):154-160.
- [19] GILLIS R J, WHITE K G, CHOI K H, et al. Molecular basis of azithromycin-resistant Pseudomonas aeruginosa biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(9):3858-3867.
- [20] STEWART P S. Mini-review: convection around biofilms[J]. Biofouling, 2012, 28(2):187-198.
- [21] 陈双红, 陈锐勇, 徐雄利, 等. 铜绿假单胞菌群体感应效应系统细菌毒力调节的研究进展[J]. 海军医学杂志, 2016, 37(2):179-181.
- [22] WINSTANLEY C, FOTHERGILL J L. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis Pseudomonas aeruginosa infections[J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 290(1):1-9.
- [23] 刘晓岚, 宋志军, 王立赞, 等. 铜绿假单胞菌 QS 系统缺陷对生物膜形成及大鼠肺部慢性感染的影响[J]. 济宁医学院学报, 2007, 30(2):100-103.
- [24] WIRTZ D C, HELLER K D, MILTNER O, et al. Interleukin-6: a potential inflammatory marker after total joint replacement[J]. Int Orthop, 2000, 24(4):194-196.
- [25] PALMER J. Biofilms: microbial life on surfaces[J]. New Zealand Science Teacher, 2011, 8(9):881-890.
- [26] BJERKAN G, WITS E, BERGH K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro[J]. Acta Orthopaedica, 2009, 80(2):245-250.
- [27] DEL POZO J L, PATEL R. Clinical practice: Infection as-

sociated with prosthetic joints [J]. N Engl J Med, 2009, 361(8):787-794.

[28] BJARNSHOLT T, TOLKER-NIELSEN T, GIVSKOV M, et al. Detection of bacteria by fluorescence in situ hybridization in culture-negative soft tissue filler lesions [J]. Dermatol Surg, 2009, 35 Suppl 2: S1620-1624.

[29] 张德刚, 于腾波. 人工关节置换术后假体感染的诊断和治疗研究进展[J]. 青岛大学医学院学报, 2010, 46(1): 92-94.

[30] TRAMPUZ A, OSMON D R, HANSSEN A D, et al. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003(414): 69-88.

[31] 段高飞, 韩峰, 李京宝, 等. 细菌生物膜相关感染的防治方法研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(5): 107-111.

[32] 陈波曼. 机械通气新生儿气管导管表面细菌生物膜形成及体外模型结构定量分析[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2006.

(收稿日期: 2017-10-25 修回日期: 2018-01-06)

• 综 述 •

miRNA 在早期心肌梗死表达新进展

马如超¹, 朱晓芸^{2#} 综述, 闫 波^{3△} 审校
(1. 山东大学齐鲁医学部, 济南 250012; 2. 武汉大学人民医院, 武汉 430060;
3. 济宁医学院附属医院, 山东济宁 272000)

摘 要:心肌梗死(MI)是由冠状动脉被完全阻塞,该部分心肌因无血液供氧而坏死,是冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)的表现类型之一。对 MI 的早期诊断可影响病情发展,甚至可逆转预后。近年研究发现,微小核糖核酸(miRNA)可作为一种特殊的生物分子标志物,在早期 MI 患者血液中检出。本文复习相关文献,对 miRNA 在早期 MI 表达的研究作一综述。

关键词:心肌梗死; 小核糖核酸; 生物学标志物; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.09.027 **中图法分类号:**R446.19

文章编号:1673-4130(2018)09-1116-04 **文献标识码:**A

据统计,我国每年死于心血管病的人数约 350 万,占居民总死亡人数的 41 %^[1]。若能早期诊断并积极干预则可能会降低病死率,诊断学的任务之一是不不断探索、发现和验证疾病的有关规律^[2]。因此,寻找一种稳定特异的生物学标志物来早期诊断尤为重要。研究发现微小核糖核酸(miRNA)与心血管系统疾病的发生发展有关^[3],且多种 miRNA 分子在冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)中具有一定的特异性。心肌梗死(MI)是由冠状动脉被完全阻塞,该部分心肌因无血液供氧而坏死,是冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)的表现类型之一。本文对 miRNA 在早期 MI 表达的研究作一综述,为临床对心血管病尤其是 MI 的早期诊断提供依据。

1 miRNA 的生物学特点

1993 年有学者首次发现 miRNA lin-4^[4-5],且发现丧失后可能会引起动物结构异常、不孕及表达信号调控丧失等^[6]。miRNA 是一类长为 19~25 个核苷酸,广布于人体的内源性非编码 RNA。它主要通过调控 mRNA 发挥功能,其主要有两种形式:(1)当两者不完全互补时,mRNA 翻译受限;(2)当两者完全互补时,引起 mRNA 降解^[7]。现有研究发现,miRNA 稳定的存在于血液中,且不受内源性核糖核酸酶的影响^[8],因而其可能作为疾病诊断的一类特殊的生物学标志物。随着对 miRNA 的深入研究,现已发现 1 000

多种 miRNA,可作为多种疾病如心血管疾病、糖尿病、自身免疫性疾病等^[9-11]诊断的一类标志物^[12]。通过检测 miRNA 的水平,可能为某些疾病的早期诊治带来福音。

2 各种 miRNA 在 MI 时水平的变化

在早期 MI 患者中,大部分 miRNA 的水平是升高的,如 miRNA-1、RNA-10、miRNA-30d、miRNA-93-5p、miRNA-103a、miRNA-122-5p、miRNA-125、miRNA-133、miRNA-208、miRNA-210、miRNA-221-3p、miRNA-423-5p、miRNA-499、miRNA-486-3p 等,也有部分可能会降低,如 miRNA-126、miRNA-145 等。下面对不同类型 miRNA 的研究进行详述。

2.1 miRNA-1 miRNA-1 在心肌中特异性表达,可能作为 MI 诊断的特异性标志物之一。研究发现 MI 患者血浆中 miRNA-1 水平明显增高,且在不同时间段也发生变化,一般在 MI 发生后逐渐增加,(8.0±0.5)h 时达高峰,后渐下降,1 周左右接近正常^[13]。这与随机对照实验结论类似,miRNA-1 在 MI 患者中水平明显高于对照组,与年龄、性别等无相关性^[14]。同样,体外实验中也发现了这一现象^[15]。在 Triton X-100 体外诱导的心肌细胞坏死模型中,心脏 miRNA-1 可以释放到培养基中并至少稳定存在 24 h;在兔的 MI 模型中 miRNA-1 在 MI 后 6 h 达到高峰(超过正常值 200 倍),3 d 后恢复正常水平。而系统评价也证

共同第一作者。 △ 通信作者, E-mail: yanbo@mail.jnmc.edu.cn。
本文引用格式: 马如超, 朱晓芸, 闫波. miRNA 在早期心肌梗死表达新进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(9): 1116-1119.