

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003240

模拟人体膀胱体外构建仿生尿流应力细菌生物膜  
动态孵育系统

安 宇, 邱明星, 刘 竞, 黄润华, 王 寓, 王世泽

(四川省医学科学院·四川省人民医院泌尿外科, 成都 610072)

**【摘要】目的:**模拟人体膀胱体外构建仿生尿流应力细菌生物膜动态孵育系统,探讨该系统的应用效果。**方法:**体外构建细菌生物膜动态孵育系统,采用大肠埃希菌为实验菌,硅胶膜片为成膜载体,建立5种尿流应力输出:生理白天和夜间分泌、生理白天排尿、病理白天和夜间排尿;设置2组仿生尿流应力流转方案:生理组和病理组。观察仿生尿流应力刺激下大肠埃希菌生物膜形成特点。检测方法包括:生物膜细菌活菌计数,荧光染色结合激光共聚焦显微镜观察,测定生物膜细菌荧光图像平均光密度值,构建生物膜立体图测量其厚度。测值多组间均数比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA),组内均数两两比较采用LSD-*t*法。**结果:**各组内比较结果显示,随孵育时间延长,生物膜细菌活菌计数值均逐渐增加,病理组48 h、静态组和生理组60 h显著增加并达到峰值( $P=0.000$ );生物膜细菌荧光图像平均光密度值和生物膜厚度测值均逐渐增加,病理组48 h、静态组和生理组72 h显著增加并达到峰值( $P=0.000$ );各组内其余测值差异无统计学意义( $P>0.01$ )。各组间比较结果显示,与静态组比较,生理组和病理组36 h、48 h、60 h、84 h、96 h生物膜细菌活菌计数值均显著增加( $P=0.000$ ),与生理组比较,病理组增加更为显著( $P=0.000$ );与静态组比较,生理组96 h,病理组48 h、96 h生物膜细菌荧光图像平均光密度值显著增多( $P=0.000$ ),生理组72 h,病理组48 h、96 h BF厚度测值显著增多( $P=0.000$ );与生理组比较,病理组48 h、96 h细菌荧光图像平均光密度值和生物膜厚度测值均显著增多( $P=0.000$ );各组间其余测值差异无统计学意义( $P>0.01$ )。**结论:**本研究模拟人体膀胱体外成功构建细菌生物膜动态孵育系统,经验证仿生尿流应力显著促进大肠埃希菌生物膜形成。

**【关键词】**膀胱;大肠埃希菌;细菌生物膜;生物学;尿流应力;动态孵育

**【中图分类号】**R378

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2022-09-27

Simulating the human bladder to construct a bacterial biofilm dynamic  
incubation system under biomimetic urinary flow stress *in vitro*

An Yu, Qiu Mingxing, Liu Jing, Huang Runhua, Wang Yu, Wang Shize

(Department of Urology, Sichuan Academy of Medical Sciences &amp; Sichuan Provincial People's Hospital)

**【Abstract】Objective:** To construct a dynamic incubation system of biomimetic urinary flow stress bacteria biofilm by simulating human bladder *in vitro*, and to explore the application effect of this system. **Methods:** For the dynamic incubation system to construct bacterial biofilm *in vitro*, we used *Escherichia coli* as the experimental bacteria and silica gel membrane as the carrier of membrane formation to establish five bionic effects of urinary flow stress: physiological secretion during the day and night, physiological urination during the day, and pathological urination during the day and night. In addition, we set up two circulation scheme groups: physiological group and pathological group to observe the characteristics of biofilm formation of *Escherichia coli* under the stimulation of bionic urinary flow stress. The detection methods included: counting the living bacteria of biofilm bacteria, fluorescence staining combined with

laser confocal microscope observation, determining the average light density value of the fluorescence image of biofilm bacteria, and constructing biofilm stereogram to measure the thickness of biofilm. The average values among multiple groups were detected by using one-way analysis of variance (ANOVA), and LSD-*t* method was used to compare the average values within groups in pairs. **Results:** Through the comparison of data in each group, with the prolongation of incubation time, the number of viable bacteria of biofilm bacteria increased gradually, and the number of viable bacteria in pathologi-

作者介绍:安 宇, Email: 403040370@qq.com,

研究方向:泌尿感染。

通信作者:刘 竞, Email: 020810908@163.com。

基金项目:四川省自然科学基金资助项目(编号:23NSFSC1558);四川省卫生健康委员会科研资助项目(编号:18PJ454);四川省医学科学院临床研究及转化基金资助项目(编号:2018LY11)。

优先出版:https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20230626.1259.002

(2023-06-27)

cal group at 48 h, static group and physiological group at 60 h increased significantly and reached the peak ( $P=0.000$ ); The measured values of average light density and biofilm thickness in the fluorescence image of biofilm bacteria increased gradually, and the measured values in the pathological group at 48 h, the static group and the physiological group at 72 h increased significantly and reached the peak ( $P=0.000$ ); There was no significant difference in other measured values in each group ( $P>0.01$ ). Through the comparison of data between groups, compared with the static group, the viable counts of biofilm bacteria in the physiological group and the pathological group at 36 h, 48 h, 60 h, 84 h and 96 h were significantly increased ( $P=0.000$ ). Compared with the physiological group, the increase in the pathological group was more significant ( $P=0.000$ ). Compared with the static group, the fluorescence image average light density of biofilm bacteria in the physiological group at 96 h and the pathological group at 48 h and 96 h increased significantly ( $P=0.000$ ), and the measured values of biofilm thickness in the physiological group at 72 h, pathological group at 48 h and 96 h increased significantly ( $P=0.000$ ). Compared with the physiological group, the measured values of the fluorescence image average light density and biofilm thickness of bacteria in the pathological group at 48 h and 96 h were significantly increased ( $P=0.000$ ). There was no significant difference in other measured values among the groups ( $P>0.01$ ). **Conclusion:** In this study, a dynamic incubation system of bacterial biofilm has been successfully constructed *in vitro* to simulate human bladder, which has been verified that the bio-mimetic urinary flow stress can significantly promote the formation of *Escherichia coli* biofilm.

**[Key words]** bladder; *Escherichia coli*; bacterial biofilm; biology; urinary flow stress; dynamic incubation

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 及其细菌生物膜 (bacterial biofilm, BF) 感染是导尿管相关性尿路感染 (catheter associated urinary tract infections, CAUTIs) 最主要的致病因素。CAUTIs 防治困难的根源在于导尿管表面形成的 BF<sup>[1]</sup>。既往 CAUTIs 相关性 BF 研究大多采用静态培养模型单一干预措施<sup>[2-3]</sup>, 然而对于人体膀胱内尿流动态又复杂的环境而言, 静态培养基无法真实地模拟 BF 生长微环境, 从而最终影响实验结果的呈现和分析。静态培养研究方法的局限性在于忽略了生物体器官、组织及细胞均处于动态流体应力微环境中这一基本规律<sup>[4]</sup>。因而笔者认为, 构建能够“尽可能真实地”符合膀胱内尿流应力环境、模拟人体膀胱生理或病理功能状态、经济适用安全有效的动态孵育模型是 BF 研究的关键环节。

据此, 本研究承接课题组前期项目<sup>[5]</sup>, 设计并改良体外构建细菌生物膜动态孵育系统, 于仿生尿流应力刺激下观察 *E. coli* BF 形成特点, 同时评估该系统的实际效用, 为泌尿系统医用植入物 BF 感染体外研究提供性能稳定的 BF 发生装置和实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

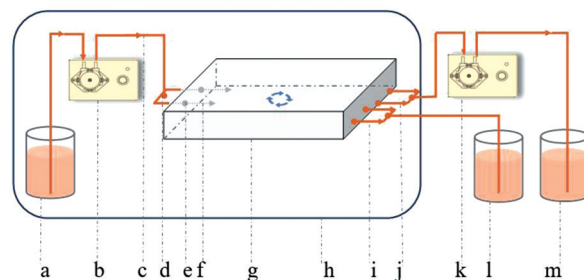
1.1.1 主要材料 *E. coli* 标准菌 (ATCC25922) 由四川省人民医院检验科提供并保存; 医用级硅胶膜片。

1.1.2 主要试剂 M-H 肉汤、M-H 琼脂、结晶紫溶液、人工尿液<sup>[6]</sup>、LIVE/DEAD R BacLight™ 细菌细胞活性测定试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)。

1.1.3 主要仪器 VITEK2.0 COMPACT 微生物分析仪、磁力搅拌器、麦氏比浊仪、酶标仪、超声波清洗器 B3200S、紫外分光光度计、智能型电热恒温培养箱、Nikon 倒置显微镜、Nikon A1R/A1 激光共聚焦显微镜、扫描电子显微镜等。

### 1.2 实验方法

1.2.1 组建 BF 动态孵育系统 组成部件: 孵育盒、智能蠕动泵, 硅胶管、三通接头、穿板直通接头、储尿器、集尿器。系统组装: 顺序连接储尿器—硅胶管—前置蠕动泵—硅胶管 (三通接头)—流入通道 I1/I2—孵育盒; ①孵育盒—流出通道 O3/O4—后置蠕动泵—硅胶管—集尿器 A; ②孵育盒—流出通道 O1/O2—硅胶管 (三通接头)—集尿器 B。总体方案示意图见图 1。编程定义蠕动泵设定尿流应力输出模式及参数见表 1。



注: a. 储尿器; b. 前置蠕动泵; c. 硅胶管; d. 三通接头; e. 穿板直通接头; f. 流入通道 I1/I2; g. 孵育盒; h. 恒温孵育箱; i. 流出通道 O1/O2; j. 流出通道 O3/O4; k. 后置蠕动泵; l. 集尿器 B; m. 集尿器 A

图 1 总体方案示意图

1.2.2 构建 BF 动态培养模型 ①细菌鉴定:微生物分析仪检测、鉴定实验菌为 *E.coli*。②感染人工尿液制备<sup>[5]</sup>。③BF 载体制备:剪裁医用级硅胶膜片 (10 mm×10 mm×3 mm) 环氧乙烷熏蒸灭菌备用。④流转方案设置:建立 5 种尿流应力输出模式:生理白天分泌、生理夜间分泌、生理白天排尿、病理白天排尿、病理夜间排尿;引入 3 类型多种干预措施:昼夜型日节律变量、尿液分泌-膀胱容受-尿液排出参数、生理排尿(排尿通畅无残余尿)-病理排尿(排尿梗阻伴残余尿)状态;设置 2 组仿生尿流应力流转方案:生理组和病理组,静态组作对照,见表 2。

1.2.3 BF 形成实验 孵育盒内设置 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h 及 96 h, 共计 9 个时间检测点分区。每区平整置入 6 张硅胶膜片 (3 张用于 BF 细菌活菌计数, 3 张用于荧光染色观察), 并设 3 个重复样。置入 37 °C 孵育箱内避光恒温孵育, 开启蠕动泵施加感染人工尿液, 加载不同流转方案。按时间点依次取出膜片, 4 °C 无菌 PBS 冲洗 3 次去除游离菌。

1.2.4 BF 细菌活菌计数<sup>[5]</sup> 标本置于含 10 mL 无菌生理盐水的试管中, 超声震荡法制备 BF 细菌稀释液, 连续稀释平板菌落计数法检测 BF 细菌活菌计数值(logCFU/mL)。

1.2.5 激光共聚焦显微镜观察<sup>[5]</sup> LIVE/DEAD® 试剂盒 Syto-9/PI 核酸探针步骤荧光染色 (SYTO-9 染色活菌呈绿色, PI 染色死菌呈红色), 免疫荧光结合激光共聚焦显微镜观察 (confocal laser scanning microscopy, CLSM) 观察 BF 细菌群落荧光图像并采图。①Image-Pro Plus 6.0 医学图像软件分析, 测定 BF 细菌荧光图像平均光密度值 (average optical density, ODav); ②构建 BF 立体图逐层扫描测量 BF 厚度值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。BF 细菌活菌计数、BF 细菌荧光图像

ODav、BF 厚度多组间均数比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA), 组内均数两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准  $\alpha=0.01$ 。

## 2 结果

### 2.1 BF 动态孵育系统

①全部组件高温消毒 (蠕动泵泵体除外), 戴无菌手套于无菌工作台顺序连接各组件, 检查无误, 置入 37 °C 恒温孵育箱。②于储尿器装满人工尿液约 500 mL, 开启前置蠕动泵 (流速范围 1.25~2.00 mL/min), 持续性生成动力将储尿器中的人工尿液经流入通道 I1/I2 “主动泵入” 孵育盒, 模拟尿液分泌。③据时点触发后置蠕动泵 (流速范围 333~1 800 mL/min), 间歇性生成动力将人工尿液经流出通道 O3/O4 “主动泵出” 到达集尿器 A, 模拟尿液排出。④I1/I2 和 O1/O2 高度落差为 10 mm (防反流或溢出), 保持孵育盒内稳定容积的人工尿液 (490 mL), 模拟膀胱容量; 人工尿液经流出通道 O1/O2 “自行流出” 到达集尿器 B。⑤全部管路通畅无渗漏; 按时更新储尿器尿液, 废弃集尿器尿液。⑥关闭蠕动泵电源, 系统停止运转, 拆除组件, 消毒备用。

### 2.2 BF 形成实验

2.2.1 BF 细菌活菌计数 ①据时间变化各组内比较: 随孵育时间延长, BF 细菌活菌计数值均逐渐增加, 病理组 48 h、静态组和生理组 60 h 显著增加并达到峰值 ( $F=218.104, P=0.000$ ); 随孵育时间继续延长, 各组内其余测值差异无统计学意义 ( $F=218.104, P>0.01$ )。②据应力变化各组间比较: 与静态组比较, 生理组和病理组 36 h、48 h、60 h、84 h、96 h BF 细菌活菌计数值均显著增加 ( $F=218.104, P=0.000$ ); 与生理组比较, 病理组增加更为显著 ( $F=218.104, P=0.000$ ); 各组间其余测值差异无统计学意义 ( $F=218.104, P>0.05$ ), 见表 3、图 2。

表 1 尿流应力输出模式及参数

编号	输出模式	工作部件	运动控制模块	平均流速/(mL·min <sup>-1</sup> )	峰值流速/(mL·min <sup>-1</sup> )	输出时间/min
1	生理白天分泌	前置泵	匀速	2	—	持续
2	生理夜间分泌	前置泵	匀速	1.25	—	持续
3	生理白天排尿	后置泵	匀加速→匀减速 <sup>a</sup>	1 633	1 800	0.3
4	病理白天排尿	后置泵	阶梯加速→阶梯减速 <sup>a</sup>	500	420	0.6
5	病理夜间排尿	后置泵	阶梯加速→阶梯减速 <sup>a</sup>	333	360	0.6

注: a, 尿流曲线均呈上升支稍快, 于尿流时间前 1/3 达到峰值流速, 下降支稍慢

表 2 仿生尿流应力流转方案

分组	模拟状态	昼夜节律	时间/h	输出模式	分泌量/mL	输出模式	触发	次数	排尿量/mL	残余量/mL
生理组	排尿通畅	白天 <sup>b</sup>	16	1	1 920	3	每 4 h	4	480	10
	无残余尿 <sup>a</sup>	夜间 <sup>c</sup>	8	2	600	—	—	0	—	—
病理组	排尿梗阻	白天 <sup>b</sup>	16	1	1 920	4	每 4 h	4	300	190
	伴残余尿 <sup>a</sup>	夜间 <sup>c</sup>	8	2	600	5	每 2 h	4	200	<290 <sup>d</sup>
静态组	对照	—	24	无尿流应力输出, 每 24 h 更换人工尿液 490 mL						

注: a, 尿液残余量 < 10~30 mL 为正常; b, 白天: 6:00~22:00; c, 夜间: 22:00~6:00; d, 夜间多次少量排尿, 残余尿量于范围 40~290 mL

表 3 各组 BF 细菌活菌计数值 (logCFU/mL;  $\bar{x} \pm s$ )

分组	孵育 6 h	孵育 12 h	孵育 24 h	孵育 36 h	孵育 48 h	孵育 60 h	孵育 72 h	孵育 84 h	孵育 96 h
静态组	5.123 ± 0.011	6.255 ± 0.125	7.242 ± 0.165	6.142 ± 0.057	7.854 ± 0.074	8.247 ± 0.096 <sup>c</sup>	7.748 ± 0.162	6.356 ± 0.168	6.375 ± 0.077
生理组	5.435 ± 0.080	6.314 ± 0.056	7.371 ± 0.111	7.784 ± 0.147 <sup>a</sup>	8.640 ± 0.114 <sup>a</sup>	8.899 ± 0.103 <sup>ca</sup>	7.685 ± 0.166	7.336 ± 0.046 <sup>a</sup>	7.235 ± 0.068 <sup>a</sup>
病理组	5.460 ± 0.110	6.344 ± 0.078	7.392 ± 0.070	8.452 ± 0.105 <sup>ab</sup>	9.240 ± 0.029 <sup>abc</sup>	8.810 ± 0.136 <sup>a</sup>	7.739 ± 0.080	7.693 ± 0.113 <sup>ab</sup>	7.631 ± 0.080 <sup>ab</sup>

注: a, 与同时点静态组相比,  $P=0.000$ ; b, 与同时点生理组相比,  $P=0.000$ ; c, 同组内与其他时间点相比,  $P=0.000$

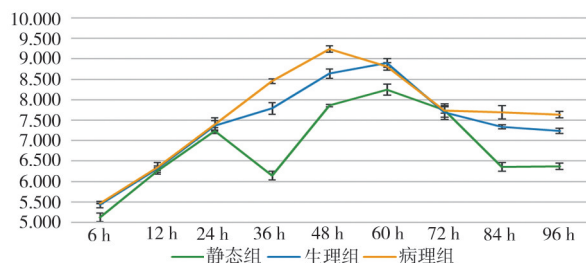


图 2 各组 BF 细菌活菌计数值折线图 (logCFU/mL)

2.2.2 BF 细菌荧光图像 Odav 和 BF 厚度测值 ①据时间变化各组内比较:随孵育时间延长, BF 细菌荧光图像 Odav 和 BF 厚度测值均逐渐增加, 病理组 48 h、静态组和生理组 72 h 显著增加并达到峰值 ( $F=23.695, P=0.000$ ); 随孵育时间继续延长, 各组内其余测值差异无统计学意义 ( $F=23.695, P>0.05$ )。②据应力变化各组间比较:与静态组比较, 生理组 96 h, 病理组 48 h、96 h BF 细菌荧光图像 Odav 显著增多 ( $F=23.695, P=0.000$ ), 生理组 72 h, 病理组 48 h、96 h BF 厚度测值显著增多 ( $F=35.394, P=0.000$ ); 与生理组比较, 病理组于 48 h、96 h 细菌荧光图像 Odav 和 BF 厚度测值均显著增多 ( $F=35.394, P=0.000$ ); 各组间其余测值差异无统计学意义 ( $F=35.394, P>0.05$ ), 见表 4、5, 图 3、4。CLSM 观察各组 BF 形成荧光染色特点, 见表 6。CLSM 观察各组 BF 细菌荧光图像和 BF 厚度立体图像, 见图 5。

表 4 CLSM 观察各组 BF 细菌荧光图像 Odav ( $200 \times$ ; Image-Pro;  $\bar{x} \pm s$ )

分组	孵育 24 h	孵育 48 h	孵育 72 h	孵育 96 h
静态组	0.104 ± 0.007	0.109 ± 0.005	0.149 ± 0.007 <sup>c</sup>	0.092 ± 0.009
生理组	0.123 ± 0.004	0.133 ± 0.011	0.171 ± 0.017 <sup>c</sup>	0.124 ± 0.009 <sup>a</sup>
病理组	0.127 ± 0.009	0.196 ± 0.006 <sup>abc</sup>	0.159 ± 0.007	0.158 ± 0.008 <sup>ab</sup>

注: a, 与同时点静态组相比,  $P=0.000$ ; b, 与同时点生理组相比,  $P=0.000$ ; c, 同组内与其他时间点相比,  $P=0.000$

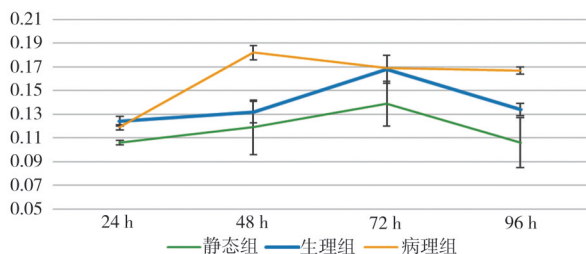
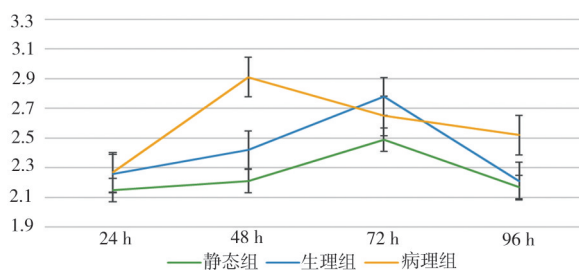


图 3 各组 BF 细菌荧光图像 Odav 折线图

表 5 CLSM 观察各组 BF 厚度测值 ( $200 \times$ ;  $\bar{x} \pm s$ ;  $\mu\text{m}$ )

分组	孵育 24 h	孵育 48 h	孵育 72 h	孵育 96 h
静态组	2.14 ± 0.04	2.21 ± 0.06	2.51 ± 0.09 <sup>c</sup>	2.16 ± 0.07
生理组	2.27 ± 0.06	2.39 ± 0.10	2.87 ± 0.04 <sup>ac</sup>	2.21 ± 0.05
病理组	2.24 ± 0.11	3.04 ± 0.09 <sup>abc</sup>	2.71 ± 0.05	2.56 ± 0.05 <sup>ab</sup>

注: a, 与同时点静态组相比,  $P=0.000$ ; b, 与同时点生理组相比,  $P=0.000$ ; c, 同组内与其他时间点相比,  $P=0.000$

图 4 各组 BF 厚度测值折线图 ( $\mu\text{m}$ )表 6 CLSM 观察各组 BF 形成荧光染色特点 ( $200 \times$ )

分组	荧光	孵育 24 h	孵育 48 h	孵育 72 h	孵育 96 h
静态组	绿染	+	+	+	+
	红染	-	-	-	+
	特点	稀疏微弱 活菌生长	局灶明亮 繁殖活跃	散在明亮 繁殖代谢	稀疏微弱 死活共存
生理组	绿染	+	++	+++	++
	红染	-	-	-	+
	特点	局灶明亮 活菌生长	散在明亮 繁殖活跃	广泛明亮 活菌致密	散在明亮 死活共存
病理组	绿染	+	+++	+++	++
	红染	-	-	-	++
	特点	散在明亮 活菌生长	广泛高亮 活菌堆积	广泛明亮 代谢活跃	散在明亮 死活共存

注: +++, 致密; ++, 散在; +, 稀疏; -, 未见

### 3 讨论

全球每年接近 1.5 亿人受到导尿管感染的影响, CAUTIs 是全世界范围内医院获得性感染最常见的类型之一, 占全球所有医院感染的 40%, 占泌尿系感染的 80%<sup>[7]</sup>。CAUTIs 以及由其引起的严重并发症 (如尿源性脓毒血症) 的发生率逐年增长, 显著增加了患者死亡率、住院时间和医疗成本。全部用于



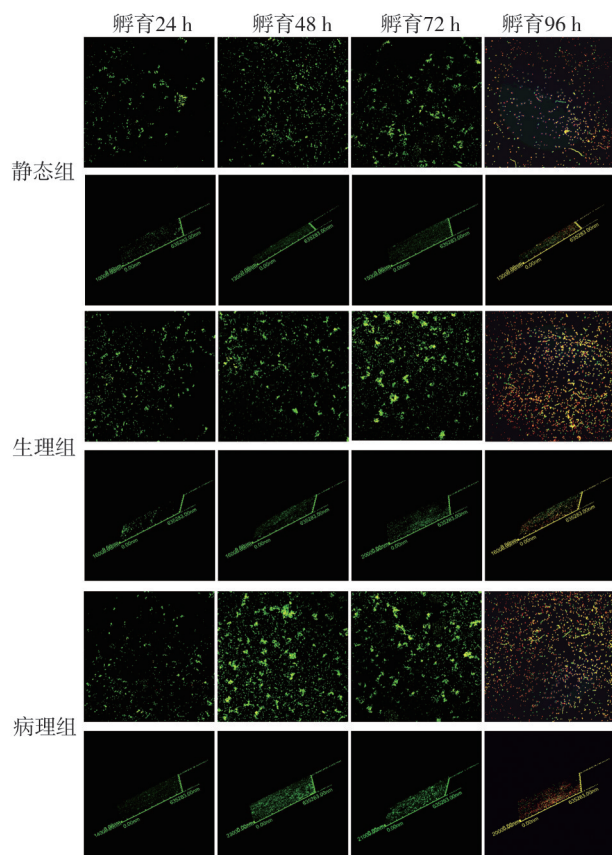


图5 CLSM观察各组BF细菌荧光图像和BF厚度立体图像  
(200×)

治疗 CAUTIs 的花费超过 4.51 亿美元/年<sup>[8]</sup>, CAUTIs 已经为全球医疗卫生保健机构带来了沉重负担。BF 是引起 CAUTIs 致病和致耐药最为重要的原因, CAUTIs 相关性 BF 致病机制和防治策略是近年来研究的热点和重点<sup>[9-10]</sup>。

BF 研究的首要条件是体外构建 BF 孵育模型。理想的 BF 孵育条件应该能够使细菌生长繁殖和 BF 发生的环境接近人体膀胱内尿流动态又复杂的微环境。既往研究大多基于静态培养模型(如试管、多孔培养板等), BF 孵育环境属于流体静力学范畴, 理论上受到的是静压力的影响; 伴随着细菌和 BF 生长繁殖的能量消耗, 培养基内的营养物质逐渐匮乏或分布不平衡, 细菌代谢产物不断积累等都会严重影响细菌和 BF 的新陈代谢。较之静态培养, 动态培养全过程营养配给均衡充足, 细菌和 BF 生长代谢水平提高, BF 可能对抗生素更具耐受性<sup>[11]</sup>。此外, 既往研究的干预措施相对单一, 不能引入持续或变化的参数, 无法充分模拟机体膀胱内的实际情况。不同的培养环境(如温度、压力、营养条件等)、培养基补充方式和更新时间周期、表面介质材料等

均可能会影响 BF 的形态和功能<sup>[12]</sup>。

从尿流应力变化流体力学角度看, 动态环境可以提供持续的流体, 这一过程中流体剪切力、流体黏性等均可能对 BF 形成的不同环节造成影响<sup>[13]</sup>, 如反应物质接触面流体力学改变、反应环境更新等, 必然导致反应效应不尽相同。模拟浮游菌在低流体剪切力环境下更容易定植和集聚于介质表面。

从模拟膀胱内环境和功能的仿生学角度来看, 健康成年人日均流经膀胱的尿液总量 1.0 ~ 2.0 L 或 1.0 mL/(h·kg<sup>-1</sup>), 昼夜量比(2 ~ 4):1, 膀胱于储尿期容受性舒张和排除期持续性收缩, 其内部自身就处于一个尿液持续流动、压力动态变化的状态。

从成本效益经济学角度看, 体外实验室研究具有经济适用、干预措施可控、重复操作强等优点。而动物实验及人体实验会带来经费预算增加、物力人力成本消耗和伦理学的问题。

上述思考为笔者研发符合膀胱内尿流应力环境、模拟人体膀胱生理或病理功能状态、经济适用安全有效的新型 BF 动态孵育系统指明了方向。前期研究中, 笔者自行设计的“灌流式膀胱细菌生物膜动态孵育模拟系统”<sup>[14]</sup>, 获得国家实用新型专利, 并已成熟应用于 BF 反应系列研究<sup>[5]</sup>。本研究承接课题组前期项目, 进一步优化设计并改良组建的“仿生尿流应力细菌生物膜动态孵育系统”在结构和功能上具有以下特点:

首先, 定义了模块化的多参数体系符合膀胱内尿流应力环境。通过编程模式定义蠕动泵的工作过程和参数, 联合运行控制模块(匀速、匀加/减速、阶梯加/减速等)、逻辑控制模块(方向、延时、触发、输出、暂停、循环等)和智能化算法, 实现复杂的仿生尿流应力流体输出。

其次, 引入多种类干预措施模拟人体膀胱生理或病理功能状态。如昼夜节律、工作时间(白天 16 h、夜间 8 h); 尿液生理分泌(白天 1 920 mL、夜间 600 mL、昼夜比 3.2:1), 膀胱容量(490 mL), 尿液排出(平均流速、峰值流速、排尿时间、排尿次数、排尿量、残余量等); 生理排尿(排尿通畅无残余尿)和病理排尿状态(排尿梗阻伴残余尿)。

最后, 经济适用、安全有效。全部组件均属于低值耗材, 拆装更换方便, 可反复消毒, 重复使用; 全部材料均达到医用级标准无细胞毒性, 符合体外微生物实验条件。

整体来说, 本系统包含 5 种尿流应力输出模式, 3 类型 10 余种干预措施, 2 组仿生尿流应力流转方

案,创新性地模拟人体膀胱体外构建连续流动、条件可控的动态化的BF孵育微环境,目前未见类似研究报道。

为评估系统的实际效用,本研究采用的检测技术包括:①BF细菌活菌计数,定量描述BF细菌繁殖能力;②BF细菌荧光图像O<sub>dav</sub>,定量描述BF细菌代谢程度;③BF厚度,定量描述BF形成能力。本研究显示,从时间维度观察,随孵育时间增加,各组BF细菌繁殖、代谢和BF形成活跃性均逐渐增加并达到峰值,病理组(排尿梗阻伴残余尿)增加最为迅速和显著(48 h);随孵育时间继续延长,静态组和生理组BF表达呈逐渐减少趋势,而病理组仍呈持续高表达趋势。从尿流应力维度观察,从静态到动态,从生理到病理,BF表达呈逐渐增加趋势,尤其病理组(排尿梗阻伴残余尿)BF表达在成熟期(48 h)和再定植期(96 h)均呈显著优势。既往研究表明<sup>[15]</sup>,施加病理尿潴留切应力刺激,可以促进*E.coli* BF显著生成,本研究结果与之类似,膀胱内尿液紊流切应力可能参与CAUTIs相关性BF感染发病机制。

然而该系统处于初步应用阶段,尚不能完全模拟人体膀胱内环境,以下方面有待改进:①系统组件:引入电脑/手机远程全自动化控制;模拟膀胱定制仿生材料孵育器实现避光密封、恒温恒湿、弹性变压等调节;②实验设计:模拟复杂的膀胱尿流应力状态:如储尿期膀胱不稳定、排尿期膀胱梗阻等;模拟上尿路尿流应力状态;③检测方法:形态学上采用电子显微镜观察BF细微结构和表征;分子水平上采用基因芯片技术定量检测BF细菌的基因表达谱变化;探寻不同尿流应力影响BF形成发挥关键作用的基因或信号通路等。

综上所述,本研究构建的细菌生物膜动态孵育系统,定义了模块化的仿生尿流应力多参数体系,实现了模拟人体膀胱生理或病理功能状态的目标,且经济适用、安全有效。经验证,仿生尿流应力能够刺激并促进*E.coli* BF形成,为BF感染相关机制的继续探索研究提供了较为理想的模型支持。

## 参 考 文 献

- [1] Stickler DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters[J]. Nat Clin Pract Urol, 2008, 5(11): 598–608.
- [2] Thibeaux R, Kainiu, Goarant C. Biofilm formation and quantification using the 96-microtiter plate[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2134: 207–214.
- [3] Grossman AB, Burgin DJ, Rice KC. Quantification of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by crystal violet and confocal microscopy[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2341: 69–78.
- [4] Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, et al. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections[J]. Pathogens, 2013, 2(2): 288–356.
- [5] 安宇,熊国兵,邱明星,等.葡萄糖对水性可降解聚氨酯装载抗菌肽LL-37抑制体外尿源性ESBLs大肠埃希菌生物膜形成的影响[J].重庆医科大学学报, 2018, 43(4): 482–489.
- An Y, Xiong GB, Qiu MX, et al. Influence of glucose on biodegradable waterborne polyurethane blend together with LL-37 in inhibiting ESBLs producing *Escherichia coli* biofilm *in vitro*[J]. J Chongqing Med Univ, 2018, 43(4): 482–489.
- [6] Chutipongtanate S, Thongboonkerd V. Systematic comparisons of artificial urine formulas for *in vitro* cellular study[J]. Anal Biochem, 2010, 402(1): 110–112.
- [7] Clarke K, Hall CL, Wiley Z, et al. Catheter-associated urinary tract infections in adults: diagnosis, treatment, and prevention[J]. J Hosp Med, 2020, 15(9): 552–556.
- [8] Zhu ZL, Wang ZP, Li SH, et al. Antimicrobial strategies for urinary catheters[J]. J Biomed Mater Res A, 2019, 107(2): 445–467.
- [9] Yu YB, Singh H, Tsitrin T, et al. Urethral catheter biofilms reveal plasticity in bacterial composition and metabolism and withstand host immune defenses in hypoxic environment[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 667462.
- [10] Hou JP, Wang LT, Alm M, et al. Enhanced antibiotic tolerance of an *in vitro* multispecies uropathogen biofilm model, useful for studies of catheter-associated urinary tract infections[J]. Microorganisms, 2022, 10(6): 1207.
- [11] Williams DL, Smith SR, Peterson BR, et al. Growth substrate may influence biofilm susceptibility to antibiotics[J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0206774.
- [12] Sillankorva S, Neubauer P, Azeredo J. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A[J]. BMC Biotechnol, 2008, 8: 79.
- [13] Bagge N, Schuster M, Hentzer M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and  $\beta$ -lactamase and alginate production[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(4): 1175–1187.
- [14] 安宇.一种灌流式膀胱细菌生物膜动态孵育模拟系统: CN107418891A[P]. 2017–12–01.
- An Y. Perfusion type bladder bacterial biofilm dynamic hatch simulation system: CN107418891A[P]. 2017–12–01.
- [15] Xiong GB, Liu AB, Wang SZ, et al. Urine turbulent shear stress system of bionic human bladder based on bacterial biofilm reactor: *in vitro* construction[J]. Chin J Tissue Engineer Res, 2021, 25(10): 1560–1565.

(责任编辑:周一青)