

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001557

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

安宇¹,熊国兵¹,邱明星¹,王坤杰²,李虹²

(1. 四川省医学科学院、四川省人民医院泌尿外科,成都 610072;2. 四川大学华西医院泌尿外科,成都 610041)

【摘要】目的:探讨葡萄糖浓度变化对水性可降解聚氨酯(biodegradable waterborne polyurethane, BWPU)装载人源抗菌肽 LL-37 体外抑制 ESBLs 大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)生物膜活性的影响。**方法:**采用尿源性 ESBLs *E.coli* 临床株(E44)为实验株, *E.coli* 标准菌株 ATCC25922(E0)做质控。构建膀胱细菌生物膜动态孵育模拟系统。“两步法”制备新型 LDI-BWPU 乳液 PCLPU33。“物理溶解和常温干燥法”制备 LDI-BWPU 装载不同 LL-37 浓度的载肽膜。设立 4 个实验分组: H 组: 高肽组(LL-37, 2 000 $\mu\text{g/mL}$)、L 组: 低肽组(LL-37, 250 $\mu\text{g/mL}$)、P 组: 阳性对照(亚胺培南, 8 $\mu\text{g/mL}$)、N 组: 阴性对照(无抗菌药), 持续感染人工尿液环境下孵育 48 h, 观察不同葡萄糖浓度(0、11.1、33.3 mmol/L)及控制葡萄糖浓度(33.3 $\rightarrow$ 0 mmol/L)对载肽膜抑制生物膜的影响。检测方法包括: 生物膜细菌活菌计数; Syto-9/PI 荧光染色结合激光共聚焦显微镜构建立体图测量生物膜厚度; 扫描电镜观察生物膜结构的细微观。生物膜细菌活菌计数和生物膜厚度的多组间均数比较采用单因素方差分析, $\alpha=0.01$ 。**结果:**基于膀胱细菌生物膜动态孵育模拟系统, 在持续感染人工尿液环境下不同葡萄糖浓度观测点, P、H、L 组生物膜活菌计数和厚度均明显低于 N 组($P=0.000$)。H 组生物膜活菌计数在无糖环境(G0 mmol/L)明显低于 L 组($P=0.000$), 在含糖环境下(G11.1, 33.3 mmol/L)与 L 组差异无统计学意义($P>0.01$); H 组生物膜厚度在不同葡萄糖观测点均明显低于 L 组($P=0.000$)。与无糖环境(G0 mmol/L)相比, 含糖环境(G11.1, 33.3 mmol/L)H、L 组生物膜活菌计数和生物膜厚度均明显增加($P=0.000$)。调控葡萄糖浓度后(33.3 $\rightarrow$ 0 mmol/L), H、L 组 BF 细菌活菌计数和生物膜厚度均明显降低($P=0.000$)。**结论:**持续感染人工尿液环境下不同葡萄糖浓度时, 载肽膜通过抑制生物膜生长、杀灭生物膜细菌明显抑制细菌生物膜形成。

【关键词】 β -内酰胺酶; 大肠埃希菌; 细菌生物膜; 葡萄糖; 可降解; 水性聚氨酯; 抗菌肽; LL-37

【中图分类号】R378

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-12

Influence of glucose on biodegradable waterborne polyurethane blend together with LL-37 in inhibiting ESBLs producing *Escherichia coli* biofilm *in vitro*An Yu¹, Xiong Guobing¹, Qiu Mingxing¹, Wang Kunjie², Li Hong²

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

2. Department of Urology, West China Hospital & West China School of Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the influence of the change of glucose concentration on 'LL-37 sustained-release BWPU membrane' in inhibiting the formation of the BF of urinary pathogenic ESBLs producing *E.coli*. **Methods:** Urinary pathogenic ESBLs producing *E.coli* isolates(E44) and standard strains ATCC25922(E0) were collected. Dynamic simulated bladder BF model was adopted. 'Two-step approach' was adopted to prepare new LDI-BWPU emulsion PCLPU33. 'Physical dissolution and air-drying' loading technique was adopted to prepare LL-37 sustained-release BWPU membrane. H group: high peptide(LL-37, 2000 $\mu\text{g/mL}$), L group: low peptide group(LL-37, 250 $\mu\text{g/mL}$), P group: positive control (Imipenem, 8 $\mu\text{g/mL}$), and N group: negative control (without antibacterial drug) were set up to incubate under artificial urine environment for 48 hours. The influence of different glucose concentrations(0, 11.1, 33.3 mmol/L), control of glucose concentration(33.3 $\rightarrow$ 0 mmol/L) on LL-37 sustained-release BWPU membrane in

inhibiting BF were observed. The detection methods included viable bacteria count method. Syto-9/P fluorescent staining, combined with laser scanning confocal microscope, was applied to construct a space diagram to measure the BF thickness. Scanning electron microscope was adopted to observe the microscopic view of BF structure. One-way analysis of variance(ANOVA)

作者介绍:安宇, Email: anyu0403@163.com,

研究方向: 泌尿感染。

通信作者:邱明星, Email: 1303624874@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号: 31600759)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180329.1624.022.html>

(2018-03-30)

was adopted in viable bacteria count, BF thickness and comparison of means of multiple groups. **Results:** For the observation point of different glucose concentration under the constantly infected artificial urine environment, the viable bacteria count and BF thickness of P group, H group, and L group were significantly decreased than that of N group ($^aP=0.000$). The viable bacteria count of group H was significantly decreased than that of L group ($^bP=0.000$) in the glucose-free environment (G0 mmol/L), and there was no statistical difference between the H and L group in the glucose-containing environment (G11.1, 33.3 mmol/L) ($P>0.01$); The BF thickness of the H group was significantly decreased than that of L group at the observation point of different glucose concentration ($^bP=0.000$). With the increase of glucose concentration, the viable bacteria count and BF thickness of the H and L groups, increased significantly ($^cP=0.000$). When glucose concentration was controlled (33.3→0 mmol/L) in the H and L groups, the viable bacteria count and BF thickness were significantly decreased ($^dP=0.000$). **Conclusion:** When the glucose concentration is different under the constantly infected artificial urine environment, LL-37 sustained-release BWPU membrane can inhibit BF growth, kill BF bacteria and significantly inhibit BF formation.

【Key words】 β -lactamases; *Escherichia coli*; bacterial biofilm; glucose; biodegradable; waterborne polyurethane; antimicrobial peptide; LL-37

导尿管相关性尿路感染(catheter associated urinary tract infections, CAUTIs)是院内感染最重要的原因之一。大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)及其细菌生物膜(bacterial biofilm, BF)感染是 CAUTIs 最主要的致病因素^[1]。使用广谱抗生素仅能消除浮游菌或延迟 BF 的形成,不能有效杀灭 BF 细菌,而且抗生素滥用已导致耐药菌,如产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)的 *E. coli* 广泛传播。此外,糖尿病患者存在泌尿系植入物 BF 感染的高风险,致使慢性、反复性、耐药性 CAUTIs 更加难以控制^[2]。除控制血糖和减少不必要的留置导尿管外,研发新型的具有抗菌效能的导尿管以对抗耐药菌 BF 相关感染迫在眉睫。然而,已报道的导尿管表面材料改性如亲水涂层等不具有抗菌效能^[3]; 抗菌药物涂层如金属离子涂层疗效不确切且存在细胞毒性^[4], 抗生素涂层的局部作用导致耐药问题等限制了抗菌导尿管的研发^[5]。因而,模拟人体正常组织固有的免疫防御体系,利用高分子材料水性可降解聚氨酯(biodegradable waterborne polyurethane, BWPU)装载具有广谱高效的抗菌活性的人源抗菌肽 LL-37,在泌尿系导管表面构建缓释抗菌药物涂层,重构类似于先天性免疫防线的抗菌机制,以阻断 BF 形成的早期生物学行为,可能成为击破糖尿病患者 CAUTIs 难治性环节的新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株:标准菌 E0, *E. coli* 标准菌株(ATCC25922)。实验菌

E44, 尿源性 ESBLs *E. coli* 临床株。均由由四川省人民医院检验科提供。LDI-BWPU 乳液 PCLPU33, 由四川大学高分子科学与工程学院提供(图 1)。主要试剂:人源抗菌肽 LL-37 购自上海耀强生物科技有限公司。亚胺培南购自美国默克制药有限公司。LIVE/DEAD® BacLight™ 细菌细胞活性测定试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。主要仪器:VITEK2.0 COMPACT 微生物分析仪, 麦氏比浊仪, 酶标仪, 紫外分光光度计, 磁力搅拌器, 智能型电热恒温培养箱, 无菌工作台, Nikon A1R/A1 激光共聚焦显微镜, Nikon ECLIPSE Ti 倒置显微镜, 扫描电子显微镜等。

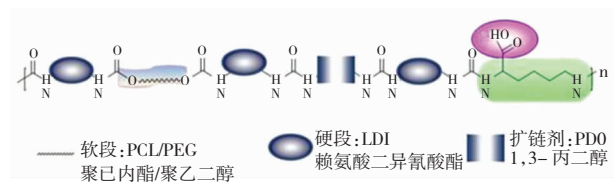


图 1 PCLPU33 分子结构示意图

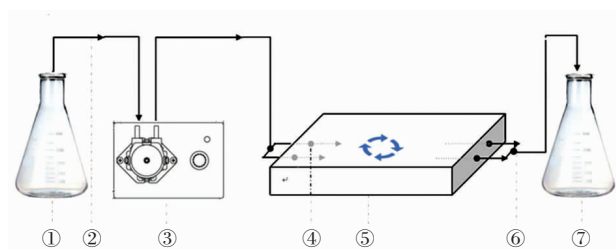
Fig.1 PCLPU33 molecular structure

1.2 实验方法

1.2.1 细菌鉴定和 BF 形成实验 细菌鉴定: 采用 VITEK2.0 COMPACT 微生物分析仪检测、鉴定实验菌 E44 为 ESBLs *E. coli*。制备人工尿液: 直接生长法将保种 E0 和 E44 菌株活化、增菌获得对数生长期的纯种菌液。比浊法测定菌落数为 $(1.0\sim2.0)\times10^8$ CFU/mL (浊度值至 0.5 麦氏单位)。Griffith 法^[6]配制无菌人工尿液。以人工尿液 1:100 稀释菌悬液, 获得感染人工尿液。加入无水葡萄糖, 配制葡萄糖浓度为 0、11.1、33.3 mmol/L 的感染人工尿液, 菌落数 $(1.0\sim2.0)\times10^6$ CFU/mL, 15 min 内使用。BF 形成实验: 采用结晶紫染色静置培养法^[7], 取 96 孔培养板加入 E44 感染人工尿液, 每孔 200 μ L。每个样本取 3 个复孔, 静置恒温孵育 24 h (37 $^{\circ}$ C), 结晶紫染色,

洗脱液以酶标仪测定 630 nm 处吸光度(absorbance, A)值。以无菌人工尿液作阴性对照,平均 A 值+3 倍标准差为阴性界限 A 值。无糖 E0 感染人工尿液作阳性对照。

1.2.2 构建膀胱细菌生物膜动态孵育模拟系统[®] 总体方案如图 2 所示。工作原理:全部组件高温消毒(蠕动泵除外),顺序连接。利用蠕动泵(流速 4~65 mL/min)将储尿器中的人工尿液泵入孵育盒形成动态孵育微环境,流出的人工尿液由集尿器收集。



①储尿器;②硅胶管;③蠕动泵;④穿板直通接头;
⑤孵育盒;⑥三通接头;⑦集尿器

图 2 总体方案示意图

Fig.2 Diagrammatic sketch

1.2.3 制备聚氨酯载膜 制备聚氨酯乳液:“两步法”⁹制备新型 LDI-BWPU 乳液 PCLPU33。第一步预聚,由 LDI 和 PCL/PEG 进行加成反应生成预聚物;第二步扩链,预聚物先后与扩链剂 PDO 和赖氨酸水溶液反应两次扩链并乳化形成乳液。成品乳液 4 ℃低温密闭保存。抗菌药物装载:“物理溶解和常温干燥法”^[10-11]制备-BWPU 装载不同浓度药物的缓释膜。分别取纯化的 LL-37 冻干粉 20、2.5 mg,溶解于 10 mL BWPU 乳液中配制含抗菌肽 LL-37 浓度为 2 000 μg/mL(H 组,高肽组, MBC 值)和 250 μg/mL(L 组,低肽组, MIC 值)的混悬液。取亚胺培南同法配制浓度为 8 μg/mL(P 组,阳性对照, MBC 值)的混悬液 10 mL。不加抗菌药物的 BWPU 乳液 10 mL(N 组,阴性对照)。混悬液滴加入 48 孔培养板,每孔 175 μL。室温(15 ℃)干燥 4 d,真空烘箱(60 ℃)恒温干燥 2 d,至溶剂水完全挥发成膜。成品 4 ℃低温密闭保存。

SEM 观察:标本置入 12 孔培养板,2.5%戊二醛室温固定 24 h,脱水、干燥、粘样、喷金后观察(工作电压 20 kV)。

1.2.4 不同葡萄糖浓度环境下载膜抑制 ESBLs *E.coli* 生物膜实验 步骤:①分组:孵育盒内设立 4 个分组 H、L、P 和 N。②加样:每组平整置入 6 张载膜(3 张用于 BF 细菌活菌计数,2 张用于荧光染色 CLSM,1 张用于 SEM)。③孵育:孵育盒接入动态孵育模拟系统,置入 37 ℃孵箱避光恒温孵育 48 h。开启蠕动泵,持续泵入 E44 感染无糖人工尿液,恒定流速约 1.5 mL/min(2 160 mL/24 h)流转。④取样:无菌生理盐水漂洗载体表面浮游菌 3 次,3 min/次。⑤送检。聚氨酯膜于无菌无糖人工尿液环境下相同条件孵育做空白对照。以上实

验重复 3 次。分别以葡萄糖浓度为 11.1、33.3 mmol/L E44 感染含糖人工尿液重复上述步骤。

连续稀释平板菌落计数法检测 BF 细菌活菌数量,定量描述载膜杀灭 BF 细菌的能力。标本置于含有 10 mL 无菌生理盐水的试管中,超声震荡 40 Hz,5 min。快速混匀器中充分混匀 3 000 r/min,20 min,使 BF 细菌脱落形成均匀细菌稀释液(10^1 倍稀释)。继而以无菌生理盐水连续稀释,获得稀释倍数为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 倍的细菌稀释液。取 3 个连续适宜稀释度,分别吸取 100 μL 稀释液加入无菌平皿中均匀涂抹。恒温孵育 48 h(37 ℃),选取菌落数在 30~300 的平板,作菌落计数。实际菌落数(CFU/mL)=(菌落计数×稀释倍数)/体积(mL);标准菌落计数单位=log 实际菌落数(CFU/mL)。以无菌生理盐水做空白对照。

LIVE/DEAD[®]试剂盒 Syto-9/PI 荧光染色,CLSM 观察 BF 细菌群落荧光图像,构建立体图测量 BF 厚度,定量描述载膜抑制 BF 生长的能力。参照说明书配制荧光染料 Syto-9/PI 工作液。标本置于 24 孔培养板中,滴加 Syto-9/PI 荧光染液至完整覆盖,室温避光孵育 15 min,以灭菌生理盐水洗 3 遍去除背景染,滤纸吸干盖玻片多余水分,立刻送检。每个标本随机选择 3 个视野观察 BF 和细菌群落的荧光图像。每个视野随机获取一个 BF 构建立体结构图测量其厚度。SEM 观察 BF 结构细微观。方法同 1.2.3。

1.2.5 调控葡萄糖浓度环境下载膜抑制 ESBLs *E.coli* 生物膜实验 分组、加样方法同 1.2.4。孵育:持续泵入葡萄糖浓度为 33.3 mmol/L E44 感染人工尿液,孵育 24 h 后泵入葡萄糖浓度为 0 mmol/L E44 感染人工尿液,继续孵育 24 h。取样、送检及检测方法同 1.2.4。

1.3 统计学方法

统计学处理采用 IBM SPSS 20.0 软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。BF 细菌活菌计数和 BF 厚度多组间均数比较采用单因素方差分析,其组间两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.01$ 。

2 结果

2.1 细菌鉴定和生物膜形成分析

经鉴定临床株 E44 为多重耐药 ESBLs *E.coli*,仅对碳青霉烯类抗生素敏感。E0、E44 在 BF 形成阳性,平均 A 值分别为: 0.118 ± 0.027 、 0.192 ± 0.051 ;阴性对照平均 A 值为: 0.073 ± 0.003 。

2.2 膀胱细菌生物膜动态孵育模拟系统

动态孵育模拟系统工作状态如图 3 所示。开启电源,蠕动泵正常运转,孵育盒内形成动态连续流动的环境。全部管道通常无渗漏。关闭电源,系统停止运转。



图3 动态孵育模拟系统

Fig.3 Dynamic simulated bladder BF model

2.3 制备聚氨酯载肽膜

聚氨酯载肽膜如图4所示。载肽膜外观呈透明圆形的固态薄片,表面光滑,触软有弹性。药物溶解其中且分布均匀,无结晶或沉淀。



图4 制备聚氨酯载肽膜

Fig.4 Preparation of LL-37 sustained-release BWPU membrane

扫描电镜下,载肽膜结构连续完整,表面光滑无突起,无微孔和裂痕。经戊二醛固定和乙醇脱水后也未见溶蚀。如图5所示。

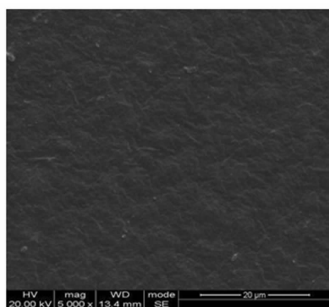


图5 SEM载肽膜表面(10 000×)

Fig.5 SEM surface of the LL-37 sustained-release BWPU membrane(10 000×)

2.4 葡萄糖对载肽膜抑制 ESBLs *E.coli* 生物膜的影响

载脂膜抑制 BF 实验各组 BF 细菌活菌计数、BF 厚度如表1、表2所示。不同葡萄糖浓度(0,11.1,33.3 mmol/L)观测点,P、H、L和N各组间比较,各组 BF 活菌计数($F=801.418$, $P=0.000$)或 BF 厚度($F=289.783$, $P=0.000$)差异均具有统计学意义。P、H、L组 BF 活菌计数和 BF 厚度均明显低于 N 组($P=$

0.000)。H 组 BF 活菌计数在无糖环境(G_0 mmol/L)明显低于 L 组($P=0.000$),在含糖环境($G_{11.1,33.3}$ mmol/L)与 L 组差异无统计学意义($P>0.01$);H 组 BF 厚度在不同葡萄糖观测点均明显低于 L 组($P=0.000$)。与无糖环境(G_0 mmol/L)相比,含糖环境($G_{11.1,33.3}$ mmol/L),H、L 组 BF 活菌计数和 BF 厚度均明显增加($P=0.000$)。调控葡萄糖浓度后($33.3 \rightarrow 0$ mmol/L),H、L 组 BF 细菌活菌计数和 BF 厚度均明显降低($P=0.000$)。CLSM 观察载肽膜表面 BF 形成荧光染色特点如表3所示,BF 细菌荧光图像如图6、7所示。SEM 观察载肽膜表面 BF 形成特点如表4所示,BF 图像如图8、9所示。

表1 载肽膜抑制细菌生物膜实验各组 BF 细菌活菌计数值(logCFU/mL)

Tab.1 Viable bacteria count value of the inhibition experiment in different groups(logCFU/mL)

组别	葡萄糖浓度 (mmol/L)			
	0	11.1	33.3	33.3→0
N组	7.555 ± 0.048	8.447 ± 0.003 ^c	8.473 ± 0.007 ^c	7.899 ± 0.022 ^d
P组	6.601 ± 0.029 ^a	8.328 ± 0.007 ^{ac}	8.346 ± 0.049 ^{ac}	7.126 ± 0.023 ^{ad}
H组	6.890 ± 0.024 ^{ab}	8.372 ± 0.033 ^{ac}	8.399 ± 0.026 ^{ac}	7.363 ± 0.036 ^{ad}
L组	7.185 ± 0.016 ^a	8.388 ± 0.011 ^{ac}	8.352 ± 0.054 ^{ac}	7.491 ± 0.025 ^{ad}

注:a,与N组相比, $P=0.000$;b:与L组相比, $P=0.000$;c:与葡萄糖0 mmol/L 各组相比, $P=0.000$;d:与葡萄糖33.3 mmol/L 各组数据相比, $P=0.000$

表2 载肽膜抑制细菌生物膜实验各组 BF 厚度值
Tab.2 BF thickness value of the inhibition experiment in different groups

组别	葡萄糖浓度 (mmol/L)			
	0	11.1	33.3	33.3→0
N组	2.37 ± 0.08	2.48 ± 0.10 ^c	2.53 ± 0.12 ^c	2.15 ± 0.08 ^d
P组	0.95 ± 0.05 ^a	1.08 ± 0.08 ^{ac}	1.07 ± 0.05 ^{ac}	0.87 ± 0.05 ^{ad}
H组	1.33 ± 0.05 ^{ab}	1.47 ± 0.05 ^{abc}	1.48 ± 0.08 ^{abc}	1.37 ± 0.05 ^{ad}
L组	1.65 ± 0.08 ^a	1.65 ± 0.05 ^{ac}	1.87 ± 0.08 ^{ac}	1.65 ± 0.10 ^{ad}

注:a,与N组相比, $P=0.000$;b:与L组相比, $P=0.000$;c:与葡萄糖0 mmol/L 各组相比, $P=0.000$;d:与葡萄糖33.3 mmol/L 各组数据相比, $P=0.000$

表3 CLSM 观察不同葡萄糖浓度各组载肽膜表面 BF 形成荧光染色特点(200×)

Tab.3 CLSM character of the biofilm formation in different groups by CLSM(Syto-9/P fluorescent staining)(200×)

G(mmol/L)	荧光	N组	P组	H组	L组
0	绿染	+++	+	-	+
	红染	-	+	+++	++
	特点	活菌生长	细菌崩解	细菌死亡	死菌为主
11.1	绿染	+++	+	+	+++
	红染	-	+	+++	+
	特点	繁殖活跃	细菌崩解	死菌为主	活菌为主
33.3	绿染	++	+	++	++
	红染	++	+	+	+
	特点	代谢活跃	细菌崩解	活菌为主	活菌为主

注: +++,致密; ++,散在; +,稀疏; -,未见

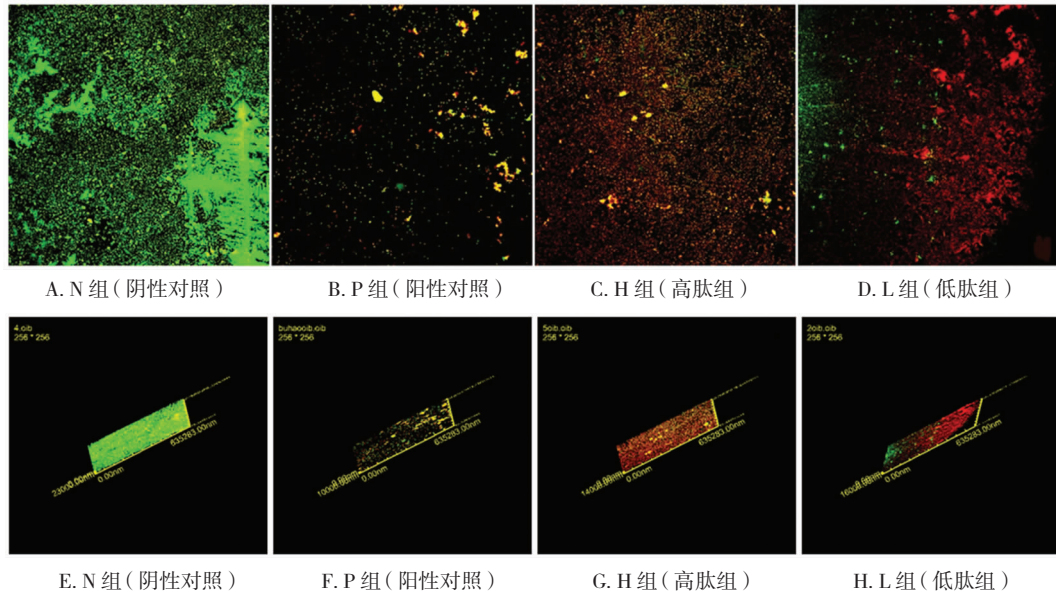


图 6 CLSM 葡萄糖浓度 0 mmol/L 环境载肽膜表面 BF 细菌荧光图像和 BF 厚度立体图像(200 ×)

Fig.6 CLSM biofilm formation and BF thickness observation in different groups by CLSM. Syto-9/P fluorescent staining(200 ×)(glucose concentration 0 mmol/L)

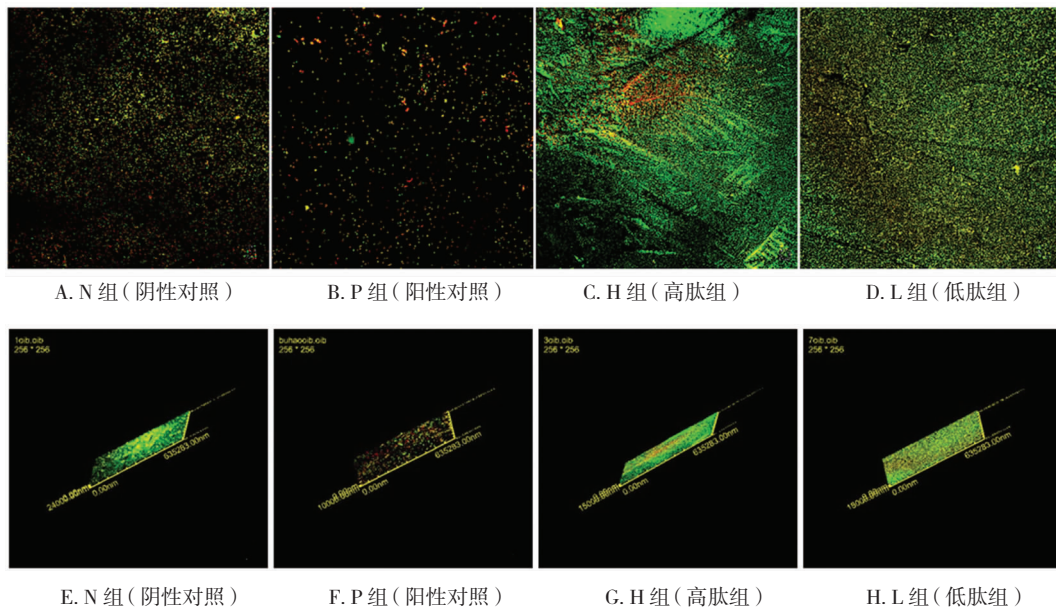


图 7 CLSM 葡萄糖浓度 33.3mmol/L 环境载肽膜表面 BF 细菌荧光图像和 BF 厚度立体图像(200 ×)

Fig.7 CLSM biofilm formation and BF thickness observation in different groups by CLSM. Syto-9/P fluorescent staining(200 ×) (glucose concentration 33.3 mmol/L)

表 4 SEM 观察不同葡萄糖浓度各组载肽膜表面 BF 形成特点(10 000 ×)

Tab.4 SEMcharacter of the biofilm formation in different groups by SEM(10 000 ×)

葡萄糖浓度 (mmol/L)	N组		P组		H组		L组	
	BF结构	BF细菌	BF结构	BF细菌	BF结构	BF细菌	BF结构	BF细菌
0	交联成熟	成团			裂隙破坏	成簇	均匀薄层	聚集
11.1	致密成熟	堆积	崩解	罕见	疏松破坏	散乱	孔隙破坏	聚集
33.3	厚实成熟	群聚			疏松破坏	散乱	均匀薄层	聚集

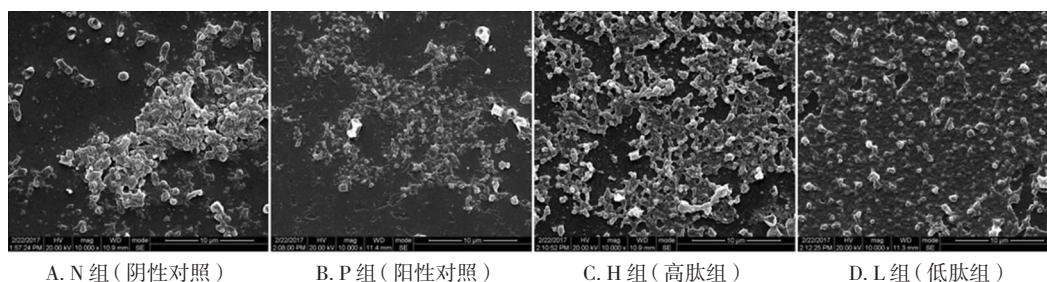


图 8 SEM 葡萄糖浓度 0 mmol/L 环境载肽膜表面 BF 图像(10 000 ×)

Fig.8 SEM biofilm formation observation in different groups by SEM(10 000 ×) (glucose concentration 0 mmol/L)

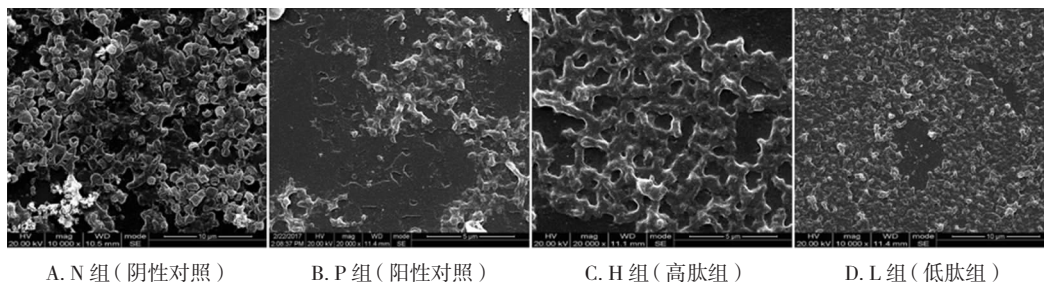


图 9 SEM 葡萄糖 33.3 mmol/L 环境载肽膜表面 BF 图像(10 000 ×)

Fig.9 SEM biofilm formation observation in different groups by SEM(10 000 ×) (glucose concentration 33.3 mmol/L)

3 讨论

研究 BF 首先需要构建 BF 孵育系统。不同培养条件、培养基加入方式及更新周期等均会影响 BF 的形态和功能。研究表明,与静置条件培养相比,流式培养条件下全过程营养供给均衡充足,细菌生长代谢水平提高,细菌产物的产量增加^[12],BF 生长更为成熟,粘附力更强^[13]。此外,动态环境提供持续的流体、剪切力、黏性等均可能影响 BF 形成^[14]。

膀胱内尿流环境是持续动态流动的状态,健康成人平均每 24 h 流经膀胱的尿液总量为 1.0~2.0 L 或 1.0 mL/(h × kg)。本研究借鉴连续灌注细胞培养工艺^[15]、管路法^[16]和流室法^[17]BF 人工发生装置的原理,创新性地构建了膀胱细菌生物膜动态孵育模拟系统,为细菌生物膜体外实验提供了良好的平台。该模型的优点包括:①实现了模拟膀胱内尿液持续平衡流动环境,进入系统的人工尿总量和速度的可调节,可以模拟生理或病理状态的尿量及昼夜节律;②试验干预条件可控化操作,如持续感染尿环境,尿液葡萄糖浓度、pH 值、盐离子浓度等动态化调整。

LL-37 作为 Cathelicidin 家族仅有的人源抗菌肽,是人类固有的抗菌防御机制的重要一员^[18]。既往研究证实,LL-37 具有广谱抗菌及抑制 BF 的功能。LL-37 抑制 BF 的浓度通常低于其对该细菌的 MIC,

抑制 BF 活性与抗菌活性并不协同一致^[19]。不同于抗生素,LL-37 主要通过杀灭浮游或生物膜致病菌^[20]、干扰 BF 形成^[21]和破坏已形成的 BF^[22]发挥抑杀 BF 的功能,因而在对抗耐药菌及其 BF 感染方面独具优势。

水性可降解聚氨酯属于可降解高分子材料的一种,可作为医源性植入物的优良材料。前期研究已经证实,水性可降解聚氨酯在自组装能力和药物装载方面具备良好的性能,其优点包括彻底的生物可降解性、安全无毒、高度生物相容性、优良的抗血栓性、力学性能优良、可常规消毒使用等^[23-24]。既往研究报道,水性可降解聚氨酯可以作为药物载体成功装载抗生素,如妥布霉素^[25]、盐酸四环素^[26]、阿霉素^[27],蛋白质如蛋白 rhBMP-2^[28],细胞因子如血小板源生长因子^[29]等。本研究优化了装载工艺,改良了药物溶解混匀方法,简化了干燥程序,成功制备了装载不同 LL-37 浓度水性聚氨酯膜,为高分子可降解基材装载抗菌药物的提供了崭新的思路和方法。

本研究发现,聚氨酯膜表面 ESBLs *E.coli* BF 形成能力随着葡萄糖浓度增加而增强,尿糖 11.1 mmol/L 出现 BF 形成的高峰。既往研究认为,葡萄糖是生物体重要供能营养物质,其浓度增加通过 *E.coli* CAMP 受体蛋白影响群体感应系统的关键调节基因 LuxS^[30]和 Agr^[31]表达进而促进 BF 形成。含有高度保守性基因 LuxS 和 pga 是调节 *E.coli* BF 形成的关键基因,

葡萄糖浓度 27.78 mmol/L(0.5%)的培养条件下,pga mRNA 高表达 BF 形成增强呈正相关,LuxS mRNA 对培养环境更为敏感,虽然表达同样增高,但与 BF 形成强弱不一致^[32]。糖尿病或糖耐量降低患者如血糖波动,尿糖定量>11.1 mmol/L^[33]。因而留置导尿管的糖尿病患者需严格控制血糖,这对于防治 BF 感染相关的 CAUTIs 意义重大。

载肽膜在不同尿糖浓度环境下均能够显著抑制尿源性 ESBLs 大肠埃希菌 BF 形成。H 组抑制 BF 活性总体强于 L 组,这可能与 H 组的持续较高水平 LL-37 释放表达有关。此外,随着尿糖浓度增高,载肽膜抑制 BF 效能降低。这可能与高糖环境为细菌提供了更加富足的能量,细菌代谢增强、浓度增加、毒力增强,而抗菌药物有效杀菌浓度相对下降有关。然而,动态调控葡萄糖浓度后(33.3→0 mmol/L),不仅聚氨酯表面 BF 形成显著减少,而且载肽膜抑制 BF 效能也显著提高。

综上所述,本研究制备的水性可降解聚氨酯装载抗菌肽 LL-37 载肽膜,在不同浓度葡萄糖浓度环境下抑制 BF 均呈现良好效能,使其可能成为新型的具有抗菌效能的导尿管表面涂层材料,并可能在防治糖尿病患者 CAUTIs 方面发挥积极的效用。但葡萄糖浓度变化影响载肽膜抑制 BF 的分子机制、载肽膜与泌尿系导管表面的涂装工艺等还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 那彦群,叶章群,孙 光. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南 2011 版[M]. 1 版. 北京:人民卫生出版社,2011:277-296.
- [2] Muller LM, Gorter KJ, Hak E, et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus[J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(3):281-288.
- [3] Deva AK, Adams WP Jr, Vickery K. The role of bacterial biofilms in device-associated infection[J]. Plast Reconstr Surg, 2013, 132(5):1319-1328.
- [4] Pickard R, Lam T, MacLennan G, et al. Antimicrobial catheters for reduction of symptomatic urinary tract infection in adults requiring short-term catheterisation in hospital: a multicentre randomised controlled trial[J]. Lancet, 2012, 380(9857):1927-1935.
- [5] Raz R, Schiller D, Nicolle LE. Chronic indwelling catheter replacement before antimicrobial therapy for symptomatic urinary tract infection[J]. J Urol, 2000, 164(4):1254-1258.
- [6] Griffith DP, Musher DM, Itin C. Urease. The preliminary cause of infection-induced urinary stones[J]. Invest Urol, 1976, 13(5):346-350.
- [7] Itoh Y, Rice JD, Goller C, et al. Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine[J]. J Bacteriol, 2008, 190(10):3670-3680.
- [8] 安 宇. 一种灌流式膀胱细菌生物膜动态孵育模拟系统: 中国, 201721211047.8 [P]. 2018-03-12.
- [9] Jiang X, Li JH, Ding MM, et al. synthesis and degradation of non-toxic biodegradable waterborne polyurethanes elastomer with poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) as soft segment[J]. Eur Polym J, 2007, 43(5):1838-1846.
- [10] 熊国兵, 王坤杰, 李 虹. 人组织蛋白酶抑制素 LL-37 复合水性聚氨酯缓释膜片抑制体外大肠埃希菌生物膜形成的体外研究[EB/OL]. (2014-10-05) [2018-03-01] <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201410-21>
- [11] 王建忠, 刘钦瑜, 王坤杰, 等. 水性可降解聚氨酯(PEGU25)装载 Bmap-18、环丙沙星、季铵盐生物缓释膜抑制细菌生物膜形成的体外研究[J]. 中国科技论文在线精品论文, 2015, 8(5):425-436.
- [12] 汤卫华, 马 霞, 贾原媛, 等. 木醋杆菌流加静置培养生产细菌纤维素[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2):21-24.
- [13] 刘芝兰, 李 宇, 刘 颀, 等. 细菌生物膜培养及评估方法[J]. 中国消毒学杂志, 2011, 28(3):309-311.
- [14] Bagge N, Schuster M, Hentzer M, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilm exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -Lactamase and alginate production[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(4):1175-1178.
- [15] Pollock J, Ho SV, Farid SS. Fed-batch and perfusion culture processes: economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty[J]. Biotechnol Bioeng, 2013, 110(1):206-219.
- [16] Bagge N, Schuster M, Hentzer M, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilm exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(4):1175-1178.
- [17] Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, et al. Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by Staphylococcus epidermidis; evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis[J]. J Bacteriol, 2003, 185(9):2879-2886.
- [18] Dürr UH, Sudheendra US. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758(9):1408-1425.
- [19] Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against Francisella[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(2):246-251.
- [20] Sol A, Ginesin O, Chaushu S, et al. LL-37 opsonizes and inhibits biofilm formation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans at subbactericidal concentrations[J]. Infect Immun, 2013, 81(10):3577-3585.
- [21] Scarsini M, Tomasinsig L, Arzese A, et al. Antifungal activity of cathelicidin peptides against planktonic and biofilm cultures of Candida species isolated from vaginal infections[J]. Peptides, 2015, 71:211-221.
- [22] Blower RJ, Barksdale SM, van Hoek ML. Snake cathelicidin NA-CATH and smaller helical antimicrobial peptides are effective against Burkholderia thailandensis[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(7):e0003862.
- [23] Ding M, Zhou L, Fu X, et al. Biodegradable gemini multiblock poly(ϵ -caprolactone urethane)s toward controllable micellization[J]. Soft Matter, 2010, 6(9):2087-2092.