

文章编号:1000-5404(2012)10-0921-03

论著

巯乙磺酸钠对家兔留置导尿管表面大肠杆菌生物膜的作用

陈 盛¹, 余加林¹, 罗则佳², 何念海³, 孙凤军⁴ (400014 重庆, 重庆医科大学附属儿童医院新生儿科¹; 610083 成都, 成都军区总医院医务部²; 400038 重庆, 第三军医大学西南医院: 儿科³, 药学部⁴)

[摘要] 目的 构建留置导尿管表面大肠杆菌生物膜(biofilm, BF)体内模型, 研究巯乙磺酸钠对体内留置导尿管表面大肠杆菌 BF 的作用。方法 家兔行导尿术, 经导尿管注入大肠杆菌 4 d, 扫描电镜及平板计数法检测留置导尿管表面大肠杆菌 BF 动物模型构建; 经导尿管灌注巯乙磺酸钠, 扫描电镜观察巯乙磺酸钠对导尿管表面大肠杆菌 BF 的作用, 平板计数法检测巯乙磺酸钠对导尿管表面细菌数的影响。结果 模型组可见大量细菌在导尿管上呈团状或膜状黏附生长, 厚薄不均的黏液状物质连接成一大片, 平均菌落计数模型组(4.76 ± 0.29)较对照组(2.49 ± 0.22)明显增多($t = 17.44, P < 0.01$); 巯乙磺酸钠干预后, 巯乙磺酸钠能减少留置导尿管表面大肠杆菌 BF 中基质样物质, 仅见散在的细菌黏附于管壁上, 有少数细菌的散在团状聚集; 平均菌落计数与空白对照组(5.77 ± 0.26)及生理盐水对照组(5.54 ± 0.52)比较, 巯乙磺酸钠组(2.85 ± 0.36)能使 BF 中的细菌数明显减少($F = 136.44, P < 0.01$)。结论 留置导尿管表面大肠杆菌 BF 动物模型成功建立; 巯乙磺酸钠对体内留置导尿管表面大肠杆菌 BF 有破坏作用。

[关键词] 巯乙磺酸钠; 大肠杆菌; 生物膜; 留置导尿管

[中图分类号] R378.21; R472.92; R978

[文献标志码] A

Effect of mesna on *Escherichia coli* biofilm on indwelling urethral catheter in rabbits

Chen Sheng¹, Yu Jialin¹, Luo Zejia², He Nianhai³, Sun Fengjun⁴ (¹Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; ²Departments of Medical Administration, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083; ³Department of Pediatrics, ⁴Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Objective To observe the effect of mesna (sodium 2-mercaptoethanesulfonate) on *Escherichia coli* (*E. coli*) biofilm (BF) on indwelling urethral catheters in rabbits. Methods Rabbits were catheterized with silicone Foley catheters (control group), and were then inoculated with *E. coli* through the catheters daily for 4 d to construct rabbit models (model group) of *E. coli* BF on indwelling urethral catheter. The rabbit models were then separately treated with mesna (mesna group) and normal saline (normal saline control group), with untreated rabbit models as blank control group. The rabbit models were estimated by scanning electron microscopy (SEM) and plate counting method. The appearance of the BF on indwelling urethral catheter was observed by SEM, and the number of the bacteria on the BF was measured by plate counting method after the model rabbits were given bladder instillation of mesna through the catheters. Results A large amount of bacteria growing on the catheters in a lumpy or membranous shape and mucoid materials among the bacteria were observed in the model group. The average colony counting (lg CFU/chip) of the model group (4.76 ± 0.29) was significantly higher than that of the control group (2.49 ± 0.22) ($t = 17.44, P < 0.01$). After mesna intervention, the SEM result showed that the mucoid materials among the bacteria significantly decreased in the mesna group compared with those in the model group. Only a few scattered bacteria and bacteria clusters adhered on the catheter surface in the mesna group. Compared with those of the blank control group (5.77 ± 0.26) and the normal saline control group (5.54 ± 0.52), the average colony counting (lg CFU/chip) on the BF of the mesna group (2.85 ± 0.36) decreased significantly ($F = 136.44, P < 0.01$). Conclusion The rabbit model of *E. coli* BF on indwelling urethral catheter is successfully constructed. Mesna has a destructive effect on *E. coli* BF on indwelling urethral catheter *in vivo*.

[基金项目] 国家自然科学基金(30772363, 81070513)

[通信作者] 余加林, E-mail: yujialin486@sohu.com

[Key words] mesna; *Escherichia coli*; biofilm; indwelling catheter

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772363, 81070513). Corresponding author: Yu Jialin, E-mail: yujialin486@sohu.com

尿路感染是常见的医院获得性感染,占医院感染的30.0%~40.0%。在这些尿路感染的病例中,有75.0%~80.0%是与留置导尿管有关,称之为留置导尿管相关性尿路感染(catheter-associated urinary tract infections, CAUTI)^[1]。导尿管表面细菌生物膜(biofilm, BF)的形成在CAUTI的发生和发展中起到了重要的作用。细菌黏附并在导尿管表面形成生物膜,它分泌的多糖蛋白复合物将细菌自身包裹其中,能阻止抗生素渗透到多糖包裹的细菌体内,导致对抗生素的强抵抗力,其抵抗宿主免疫的能力也大大强于浮游细菌,从而造成泌尿道感染的迁延不愈^[2]。

巯乙磺酸钠在临床上多将其作为黏液溶解剂^[3]及泌尿系统保护剂^[4],它是含有活性巯基(-SH)的化合物,可使痰液中糖蛋白多肽链的二硫键断裂,使糖蛋白分解,黏痰液化;同时对脱氧核糖核酸纤维也有裂解作用,黏液溶解作用较N-乙酰半胱氨酸更强^[3]。大肠杆菌是尿路感染中最常见的致病菌,占急性感染的80%~90%,在导尿管上也极易形成BF^[5]。我们前期研究已证实了巯乙磺酸钠在体外有抗大肠杆菌黏附的作用^[6],也能阻止大肠杆菌生物膜的形成和破坏成熟生物膜(数据未发表),为了进一步了解巯乙磺酸钠在体内是否具有消除BF的作用,我们首先建立了留置导尿管大肠杆菌BF动物模型,考察巯乙磺酸钠对大肠杆菌BF的体内作用,以期在临床上治疗留置导尿管大肠杆菌BF感染提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物、菌株及主要材料

实验动物3~4个月龄,雄性家兔40只,体质量2~3 kg,第三军医大学实验动物中心提供;大肠杆菌ATCC 25922,第三军医大学西南医院药学部实验室保存;巯乙磺酸钠标准品(SIGMA公司,美国);L-Broth培养基(升博生物制品公司)按说明配制,高温灭菌后4℃保存备用;S-3400N扫描电镜(SEM)(日本HITACHI公司,第三军医大学电镜室提供),比浊仪(德国Siemens公司),普通医用F8硅胶导尿管(深圳市华丰利橡塑制品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 留置导尿管大肠杆菌BF动物模型的构建 实验分组:分别取16只家兔随机分为模型组、对照组,每组8只。挑取大肠杆菌ATCC 25922单菌落接种于L-Broth培养基中,37℃,180 r/min振荡培养过夜。比浊仪测定菌液D(600)值,调整D(600)值至0.8,2组家兔经消毒后耳缘静脉3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)麻醉。仰卧消毒会阴,8F双腔导尿管前端石蜡润滑后行导尿术。模型组每日分别经导尿管注入活化大肠杆菌菌液1 ml,对照组注入生理盐水1 ml,留置导尿管,连续

4 d后,无菌操作后处死两组动物,纵向解剖尿道,移出导尿管,在导尿管末端分别取0.5 cm和1 cm导尿管片段供扫描电镜及细菌计数分析。

1.2.2 巯乙磺酸钠的治疗 实验分组:分别取24只,家兔随机数字法分为空白对照组、生理盐水对照组、巯乙磺酸钠治疗组,每组各8只。按上述方法每日注入大肠杆菌4 d后,生理盐水对照组、巯乙磺酸钠治疗组经导尿管分别注入生理盐水5 ml、巯乙磺酸钠(20 mg/ml)5 ml,空白对照组不注入任何液体,夹闭导尿管1.5 h,每日2次,连续3 d后按上述方法分别取0.5 cm和1 cm导尿管片段供扫描电镜及细菌计数分析。

1.2.3 扫描电镜观察留置导尿管表面大肠杆菌BF的形态

导尿管片段用灭菌生理盐水多次充分漂洗,去除浮游菌。立即用2.5%戊二醛溶液固定2 h后,再经0.1 mol/ml PBS冲洗2次(pH=7.2),30%~100%系列浓度乙醇脱水后,经50%~100%叔丁醇置换,干燥、离子溅射仪喷金,经系列处理后制备电镜标本进行扫描电镜观察大肠杆菌BF微观形态。

1.2.4 菌落计数法检测留置导尿管表面细菌数 导尿管片段用无菌的磷酸盐缓冲液冲洗3~5次,以洗去游离细胞。然后将导尿管片段放入磷酸盐缓冲液中超声20 min,以使黏附的细胞脱落。最后将细胞悬浮液稀释到合适浓度,涂布于固体的L-Broth培养上,37℃培养48 h后计数。

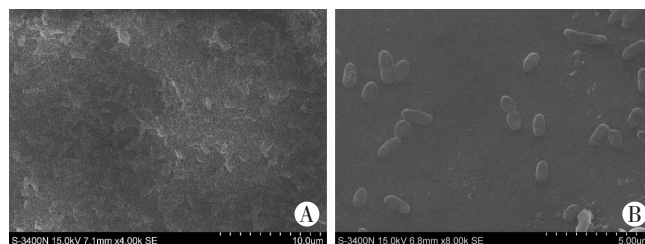
1.3 统计学方法

用SPSS 13.0统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的均数比较采用一元方差分析(One-Way ANOVA),均数之间的多重比较采用Scheffe方法(方差齐)或者Tamhane方法(方差不齐)进行。

2 结果

2.1 留置导尿管表面大肠杆菌BF动物模型的建立

连续注入大肠杆菌4 d后,模型组BF的SEM图像(图1A)显示,杆状的细菌在硅胶导尿管上生成团状或膜状黏附生长,厚薄不均的黏液状物质连接成一大片,细菌包裹其内,细菌计数显示导尿管上有大量细菌黏附,大肠杆菌BF内活菌数(Log₁₀CFU/片)模型组为(4.76±0.29),对照组为(2.49±0.22)(P<0.01, n=8);对照组(图1B)仅见少许细菌黏附,未见明显基质样物质,黏附细菌计数少(t=17.44, P<0.01),表明留置导尿管表面大肠杆菌BF体内模型得以成功构建。



A:模型组(×4 000);B:对照组(×8 000)

图1 建立动物模型实验留置导尿管表面大肠杆菌BF的SEM图像

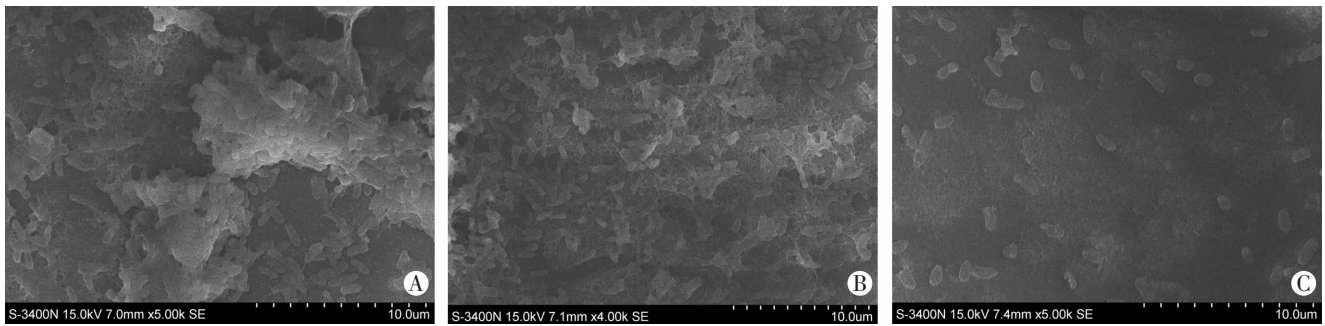


图2 干预实验留置导尿管表面大肠杆菌BF的SEM图像

2.2 巯乙磺酸钠对留置导尿管表面大肠杆菌BF的作用

空白对照组SEM图像(图2A)显示团状或膜状黏附较模型组增多,可见大量黏液状物质及细菌;生理盐水对照组(图2B)显示导尿管上仍有大量黏液样物质生产,内含大量细菌,与空白对照组比较无明显减少($F=0.84, P>0.05$);而经巯乙磺酸钠治疗后,SEM图像(图2C)显示,留置导尿管表面大肠杆菌BF中基质样物质明显减少,仅见散在的细菌黏附于管壁上,有少数细菌的散在团状聚集。细菌计数显示经巯乙磺酸钠治疗后导尿管上黏附细菌明显减少,大肠杆菌BF内活菌数(Log_{10} CFU/片)空白对照组为(5.77 ± 0.26),生理盐水组为(5.54 ± 0.52),巯乙磺酸钠治疗组为(2.85 ± 0.36), ($F=136.44, P<0.01, n=8$)。

3 讨论

导尿管上BF形成使CAUTI发展成为难治性、反复性感染。抗生素是临床控制导尿管上BF的常用方法,但常常难以达到疗效,而且易造成了耐药菌株,增加了患者负担。目前,清除导尿管上BF方法还比较有限,主要有:①抗菌药物的使用,从生物装置上不断释放抗菌药物,但抗菌药物很快可被宿主蛋白包被而失效,除此之外,抗菌药物的过量使用还可以造成耐药菌株的产生;②在生物装置上敷以特殊的金属元素,如铜、镍、银等可减少BF形成^[7],但由于工艺复杂和重金属的毒性而使用受限;③其他:如动物血清、黏附蛋白抗体、抗菌多肽等虽有减少BF生成的作用,但因其价格昂贵临床难以广泛应用。本实验采用连续4d导尿管内注入大肠杆菌制备留置导尿管表面大肠杆菌BF动物模型,4d后导尿管上可见明显的大肠杆菌包埋与大量基质中,BF形成明显,表明模型制备成功。留置导尿管BF动物模型,国内外尚未发现有相关报道。本研究构建的动物模型既反映了临床实际,又节约了实验资源,具有一定的应用价值。后从定性、定量两方面考察了巯乙磺酸钠对家兔留置导尿管表面大肠杆菌BF的作用,研究发现,巯乙磺酸钠灌注后家兔导尿管上成熟的大肠杆菌BF结构破坏,基质样物质明显减少,黏附细菌数减少,表明巯乙磺酸钠具有消除留

置导尿管BF的作用。

巯乙磺酸钠抑制大肠杆菌BF的机制目前还不完全清楚。根据国内外学者对一些与巯乙磺酸钠类似的含巯基化合物抑制BF的机制的研究,我们推测,巯乙磺酸钠抑制大肠杆菌BF可能与其所含活性巯基有关,活性巯基能使BF胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)中的重要组成成分之一的胞外蛋白多肽链的二硫键断裂,其所含磺酸基也是良好的溶解剂,有利于胞外蛋白的溶解;除此之外,巯乙磺酸钠作为还原剂,可能使大肠杆菌抗氧化系统OxyR调节子由氧化状态向还原态转化,而还原态的OxyR能抑制flu基因,进而抑制生物膜形成蛋白Ag43的表达,阻止了生物膜的形成^[8]。

参考文献:

- [1] Esposito S, Noviello S, Leone S. Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology and prevention[J]. *Infez Med*, 2008, 16(3): 130-143.
- [2] Stickler D J, Zimakoff J. Complications of urinary tract infections associated with devices used for long-term bladder management[J]. *J Hosp Infect*, 1994, 28(3): 177-194.
- [3] Ludwig U, Riedel M K, Backes M, et al. MESNA (sodium 2-mercaptoethanesulfonate) for prevention of contrast medium-induced nephrotoxicity - controlled trial[J]. *Clin Nephrol*, 2011, 75(4): 302-308.
- [4] Tekeres M, Horvath A, Bardosi L, et al. Clinical studies on the mucolytic effect of mesna [J]. *Clin Ther*, 1981, 4(1): 56-60.
- [5] Watts RE, Hancock V, Ong C L, et al. Escherichia coli isolates causing asymptomatic bacteriuria in catheterized and noncatheterized individuals possess similar virulence properties [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(7): 2449-2458.
- [6] 陈盛,余加林,何念海,等. 巯乙磺酸钠对大肠杆菌生物膜早期黏附及胞外聚合物的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(24): 2554-2557.
- [7] 邹志慧,余加林,刘官信,等. 纳米银离子对铜绿假单胞菌生物被膜的细菌死亡率的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(14): 1337-1340.
- [8] Schembri M A, Hjerrild L, Gjermansen M, et al. Differential expression of the Escherichia coli autoaggregation factor antigen 43 [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(7): 2236-2242.

(收稿:2012-01-04;修回:2012-03-08)

(编辑 邓强庭)