

**博士学位论文**



**大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜的影响及在人工关节假体 感染治疗中的应用**

Effect of Allicin on *S.epidermidis* Biofilm Formation and

Application in Prosthetic Joint Infection

**专业名称：**骨外科学**博士研究生：**翟浩瀚 **研究生导师：**白波教授

目 录

[英文缩写对照](#_Toc686488948) 2

[中文摘要](#_Toc686488949) 4

[第一部分 大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜形态结构的影响](#_Toc686488950) 4

[第二部分 大蒜素对表皮葡萄球菌产生多糖粘附素及其调控基因的影响目的：探讨亚抑菌浓度大蒜素干预对表皮葡萄球菌生物膜主要成分PIA的作](#_Toc686488951) 4

[第三部分 大蒜素对高分子聚乙烯和金属钛材料表面表皮葡萄球菌粘附影响及联合万古霉素对生物膜内菌的杀灭作用](#_Toc686488952) 5

[4 mg/L）,](#_Toc686488953) *[P](#_Toc686488953)*[＜0.05。高分子聚乙烯表面生长的生物膜各组的吸光度分别为：4.38](#_Toc686488953) 5

[第四部分 人工关节假体感染兔模型的建立与评估](#_Toc686488954) 5

[第五部分 大蒜素联合万古霉素灌洗兔人工关节假体感染的体内实验研究](#_Toc686488955) 5

**[Abstract](#_Toc686488956)** 6

**[1. Effects of Allicin on the Staphylococcus Epidermidis Adhesion and Biofilm Formation on the Surface of Ultra-Highmolecular Weight Polyethylene and Titanium A11oy](#_Toc686488957)** 7

[前 言](#_Toc686488958) 8

[2 周，此时多个术中获得微生物标本进行培养，针对培养结果，再应用抗生素治](#_Toc686488959) 9

[第一部分 大蒜素对表皮葡萄球菌Th物膜形态结构的影响](#_Toc686488960) 10

**[1.](#_Toc686488961)** [材料与方法](#_Toc686488961) 10

**[2.](#_Toc686488962)** [结果](#_Toc686488962) 11

**[3.](#_Toc686488963)** [讨论](#_Toc686488963) 12

[调控基因的影响](#_Toc686488964) 13

**[1.](#_Toc686488965)** [材料与方法](#_Toc686488965) 13

**[2](#_Toc686488966)** [结果](#_Toc686488966) 16

[3 讨论](#_Toc686488967) 17

[第三部分 大蒜素对超高分子聚乙烯和钛合金材料表面表皮葡萄球菌粘附影响及联合万古霉素对](#_Toc686488968)**[Th](#_Toc686488968)**[物膜内菌的杀灭作用](#_Toc686488968) 19

**[1.](#_Toc686488969)** [材料与方法](#_Toc686488969) 19

**[2.](#_Toc686488970)** [结果](#_Toc686488970) 20

**[3.](#_Toc686488971)** [讨论](#_Toc686488971) 24

[第四部分 人工关节假体感染兔模型的建立与评估](#_Toc686488972) 25

**[1.](#_Toc686488973)** [材料与方法](#_Toc686488973) 25

**[2](#_Toc686488974)** [结果](#_Toc686488974) 26

**[3](#_Toc686488975)** [讨论](#_Toc686488975) 27

[第五部分 大蒜素联合万古霉素灌洗兔人工关节假体感染的实验研究](#_Toc686488976) 27

**[1.](#_Toc686488977)** [材料与方法](#_Toc686488977) 28

**[2](#_Toc686488978)** [结果](#_Toc686488978) 29

**[3](#_Toc686488979)** [讨论](#_Toc686488979) 30

[全文总结与展望](#_Toc686488980) 30

[参考文献](#_Toc686488981) 31

[综述](#_Toc686488982) 36

[结 论](#_Toc686488983) 37

**[References](#_Toc686488984)** 37

[攻读学位期间取得的研究成果](#_Toc686488985) 39

[学位论文独创性声明](#_Toc686488986) 41

[学位论文知识产权权属声明](#_Toc686488987) 41

[学位论文使用授权声明](#_Toc686488988) 41

# 英文缩写对照

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
| PJI | Prosthetic joint infections | 人工关节假体感染 |
| BSD | Biofilm associated disease | 生物膜病 |
| PIA | Polysaccharide intercellular adhesion | 胞外多糖粘附因子 |
| MRSA | Methicillin-resistantStaphylococcus aureus | 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 |
| DAR | Debridement and retention of the prosthesis | 清创术并保留假体 |
| TBS | Tryptone soya broth | 胰蛋白胨大豆肉汤 |
| BF | biofilm | 生物膜 |
| CNS | Coagulase-negative staphylococci | 凝固酶阴性葡萄球菌 |
| PBS | Phosphate buffer solution | 磷酸缓冲液 |
| MIC | Minimal inhibitory concentrations | 最小抑菌浓度 |
| SEM | Scanning electron microscope | 扫描电子显微镜 |
| UHMWPE | Ultra-highmolecular weight polyethylene | 超高分子聚乙烯 |
| CLSM | Confocal laser scanning microscopy | 激光共聚焦显微镜 |
| CFU | Colony-Forming Units | 集落形成单位 |
| PNAG | Poly-·N --acetylglucosamine | N-乙酰葡糖胺 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | 磷酸盐缓冲液 |
| ATCC | American Type Culture Collection | 美国国家标准菌种保藏中心 |

1

**大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜的影响及在人工关节感染治疗中的应用**

# 中文摘要

**研究背景**

在骨科的人工关节假体周围感染中，表皮葡萄球菌是主要致病菌之一，其发病机制是细菌在假体表面形成生物膜，生物膜可抵御宿主免疫系统和抗生素发挥作用，给临床治疗带来了极大的困难。目前骨科临床治疗策略是一期或二期假体置换、移除假体伴或不伴关节融合、截肢、清创保留假体和长期抗生素压制，但临床治疗后仍有较高的复发率，而且整个治疗时间长、经济花费大。所以，人工关节感染的治疗是骨科亟待解决的难题。

大蒜素具有抗炎、抗氧化和调节免疫功能的作用，近期发现大蒜素可以抑制多种细菌生物膜的产生，但目前其确切的机制并不清楚。生物膜的形成先决条件是细菌的粘附和聚集，这一过程中的关键物质是胞外多糖粘附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)发挥了重要作用。大蒜素是否可能通过对多糖粘附素及其相关基因表达的影响来干预表皮葡萄球菌生物膜形成，目前并不知道。我们希望通过实验对这一假设进行研究，探究大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜形成影响的机制。

大蒜素已经是临床应用的药物，其抗生物膜特性若能通过体外和体内试验得以证实，将有助于其作为抗生物膜药物应用到人工关节感染治疗中，我们通过观察大蒜素对于表皮葡萄球菌在人工关节常用材料上的粘附和生物膜形成的影响、建立人工关节感染的动物模型、应用大蒜素联合万古霉素灌洗治疗感染关节一系列实验研究，探究大蒜素对超高分子聚乙烯(ultra-highmolecular weight polyethylene, UHMWPE)和钛合金材料表面生物膜形成的抑制作用，以及联合万古霉素后对生物膜内细菌影响。为其临床应用提供科学依据。

2

# 第一部分 大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜形态结构的影响

**目的：**确定大蒜素对表皮葡萄球菌的最小抑菌浓度（minimal inhibitory

concentrations，MIC），平板法建立表皮葡萄球菌生物膜模型，通过生物膜定量分析和扫描电子显微镜（scanning electron microscope, SEM）观察评估不同浓度大蒜素干预下表皮葡萄球菌生物膜变化。

**方法：**平板培养法培养表皮葡萄球菌24小时，得到成熟生物膜，用扫描电镜观察生物膜形态结构；结晶紫染色生物膜，在波长590nm下读数，确定生物膜的量，比较不同浓度的大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜形成的影响。

**结果：**大蒜素对表皮葡萄球菌的最低抑菌浓度（MIC）8mg/L，不同浓度大蒜素干预后生物膜含量分别为2.89±0.19（生理盐水组）、2.16±0.26（1/8MIC大蒜素组）、1.55±0.16（1/4MIC大蒜素组）、0.79±0.14（1/2MIC大蒜素组），P﹤0.05。扫描电镜图显示在1/2MIC浓度的大蒜素干预后，在UHMWPE材料表面仅残留少量的表皮葡萄球菌，没有明显的生物膜发现，而随着干预的大蒜素浓度的下降，扫描电镜图显示的生物膜逐渐增多。

**结论：**亚抑菌浓度大蒜素有效抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成。

# 第二部分 大蒜素对表皮葡萄球菌产生多糖粘附素及其调控基因的影响目的：探讨亚抑菌浓度大蒜素干预对表皮葡萄球菌生物膜主要成分PIA的作

用。研究其对PIA合成过程中起重要作用的基因表达的影响。

**方法：**绘制葡萄糖曲线，利用硫酸-苯酚法检测PIA含量；RT-PCR检测亚抑菌浓度的大蒜素对PIA合成过程中起重要作用的基因icaA、icaR、luxS和sigB表达的影响。

**结果：**葡萄糖曲线回归方程：Y＝0.638X+0.036，R2＝0.994，在大蒜素干预组PIA总量/µg为48.691±1.184，对照组为97.541±1.728，（P＜0.05）；细菌干重/mg大蒜素干预组为2.103±0.062，对照组为2.816±0.073，（P＜0.05）；

PIA总量（µg）/细菌干重(10mg)大蒜素干预组为307.241±14.563，对照组为393.215±17.835，(P＜0.05)，icaA mRNA的表达对照组与大蒜素在分别为

（0.6310±0.0401）和(0.4084±0.0461)，(P＜0.05)；icaR mRNA的表达对照

3

组与大蒜素在分别为(0.2826±0.0636)和(0.4253±0.0513)，（P＜0.05）；luxS

mRNA的表达对照组与大蒜素在分别为(0.1611±0.0481)和(0.3491±0.0295)，

（P＜0.05）；sigB的表达对照组与大蒜素在分别为(0.5281±0.0395)和(0.37854±0.0417)，（P＜0.05）。

**结论：**亚抑菌浓度的大蒜素能够降低正调控基因icaA和SigB的表达和增加负调控基因icaR和luxS的表达来减少表皮葡萄球菌生物膜中PIA的产生，进而抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成

# 第三部分 大蒜素对高分子聚乙烯和金属钛材料表面表皮葡萄球菌粘附影响及联合万古霉素对生物膜内菌的杀灭作用

**目的：**探讨大蒜素对表皮葡萄球菌在超高分子聚乙烯和钛合金表面粘附和生物膜形成的影响，观察大蒜素联合万古霉素对生物膜内表皮葡萄球菌的杀灭作用。

**方法：**利用细菌计数、生物膜定量试验、激光共聚焦显微镜了解不同浓度大蒜素对表皮葡萄球菌在UHMWPE和钛合金表面粘附及生物膜形成的影响，通过L/D染色观察在大蒜素联合万古霉素情况下生物膜菌的生存情况。

**结果：**在不同浓度的大蒜素干预组之间，单位面积的高分子聚乙烯材料表面粘附的细菌数分别为：8.05×104CFU/mm2（大蒜素浓度为0 mg/L）、6.50×104CFU/mm2（大蒜素浓度为1mg/L）、5.63×104CFU/mm2（大蒜素浓度为2mg/L）、

2.12×103CFU/mm2（大蒜素浓度为4mg/L）, *P*＜0.05。单个钛合金螺钉表面细菌数分别为：8.45×104CFU（大蒜素浓度为0 mg/L）、5.78×104CFU（大蒜素浓度为1mg/L）、1.86×104CFU（大蒜素浓度为2mg/L）、7.07×103CFU（大蒜素浓度为

## 4 mg/L）, *P*＜0.05。高分子聚乙烯表面生长的生物膜各组的吸光度分别为：4.38

±0.55（大蒜素浓度为0 mg/L）、4.17±0.67（大蒜素浓度为1 mg/L）、2.20

±0.69（大蒜素浓度为2 mg/L）、0.62±0.38（大蒜素浓度为4 mg/L）, *P*＜0.05。钛合金螺钉表面生长的生物膜各组的吸光度分别为：3.43±0.51（大蒜素浓度为0 mg/L）、3.29±0.53（大蒜素浓度为1 mg/L）、2.74±0.58（大蒜素浓度

为2 mg/L）、0.59±0.25（大蒜素浓度为4 mg/L）, *P*＜0.05。生物膜内表皮葡萄球菌存活状况，在生理盐水组，死菌占14.81%，活菌占85.19%；大蒜素干预

4

组，死菌占21.74%，活菌占78.26%；万古霉素干预组，死菌占41.67%，活菌占

58.33%；大蒜素联合万古霉素干预组，死菌占83.33%，活菌占16.67%；*P*＜0.05。**结论：**亚抑菌浓度的大蒜素能够抑制表皮葡萄球菌在UHMWPE和钛合金材料

表面粘附，抑制生物膜在上述材料的形成。亚抑菌浓度大蒜素联合万古霉素能有效杀灭生物膜内的表皮葡萄球菌。

# 第四部分 人工关节假体感染兔模型的建立与评估

**目的：**利用新西兰白兔建立人工关节假体感染模型并对模型进行评估

**方法：**将UHMWPE和钛合金假体植入到新西兰白兔膝关节，接种不同浓度为表皮葡萄球菌与关节腔内，构建人工关节假体感染动物模型，对动物模型进行评估，选择最佳接种方案。

**结果：**实验取材时所有的动物在取出标本时均成活，所有试验兔血培养均是阴性，伤口发生裂开或红肿情况：A组0例、B组1例、C组1例、D组3例，没有其他并发症出现。各组动物在实验过程中体温分别为：A组（接种生理盐水）

38.4±1.7℃，B组（接种浓度为1×103 CFU/ml的大蒜素）38.9±1.2℃，C 组

（接种浓度1×104 CFU/ml的大蒜素）39.0±1.5℃，D组（接种浓度1×105CFU/ml的大蒜素）38.8±1.3℃，（*P*＞0.05），A组膝关节软组织和植入的假体感染率

0%，C组和D组动物假体和膝关节周围软组织感染率都为100%, B组中软组织和假体感染率分别是25%和37.5%。

**结论**：植入UHMWPE垫圈和钛合金螺钉于新西兰白兔膝关节，接种1mL的104菌落形成单位的表皮葡萄球菌能稳定地在假体表面形成生物膜，成功构建人工膝关节假体感染动物模型。

# 第五部分 大蒜素联合万古霉素灌洗兔人工关节假体感染的体内实验研究

**目的：**利用大蒜素的抗生物膜作用，研究亚抑菌浓度大蒜素联合万古霉素灌洗人工关节感染的关节腔后对假体表面生物膜及细菌的影响。

**方法：**32只新西兰白兔制作表皮葡萄球菌感染的兔人工关节假体感染模型，随机分为4组，分别用生理盐水，大蒜素、万古霉素和大蒜素联合万古霉素灌洗

5

关节腔，对假体周围软组织和假体表面细菌计数，对UHMWPE材料表面扫描电子显微镜评价疗效。

**结果：**扫描电子显微镜观察显示，生理盐水灌洗组可见大量的生物膜和堆积的细菌；万古霉素灌洗组可见有较多的生物膜和一些镶嵌在生物膜内的细菌；大蒜素灌洗组的细菌生物膜的形成显著减少，但仍然可见大量细菌存在；万古霉素和大蒜素治疗组几乎无可见的生物膜，只有零星的细菌被发现。螺钉的超声洗脱液细菌计数：生理盐水灌洗组（A组）、万古霉素灌洗组（B组）、大蒜素灌洗组（C组），万古霉素联合大蒜素组（D组）的细菌计数（表示为log10CFU /毫升）分别为

4.94±0.72、4.13±0.95，4.45±0.63和2.88±0.56，（*P*＜0.01）。各组软组织

细菌计数，生理盐水（A组），万古霉素（B组），大蒜素（C组），万古霉素和大蒜素组

（D组）的细菌计数（表示为log10CFU /毫升）分别为4.90±0.79、4.49±0.74, 4.01

±0.77和3.85±0.96。在生理盐水组与万古霉素组、生理盐水组与大蒜素联合万古霉素组间差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。而在万古霉素组与大蒜素联合万古霉素在之间差异没有统计学意义（*P*＞0.05），在大蒜素组与生理盐水组之间差异没有统计学意义。

**结论：**亚抑菌浓度的大蒜素联合万古霉素灌洗兔人工关节假体感染模型，能有效杀灭生物膜内的表皮葡萄球菌。大蒜素作为一种有效的抗生物膜制剂，有希望成为治疗人工关节感染新的途径。

关键词：大蒜素； 生物膜； 人工关节； 感染； 假体； 超高分子聚乙烯； 钛合金； 表皮葡萄球菌

6

**Effect of Allicin on Staphylococcus EpidermidisBiofilm Formation and Application in Prosthetic Joint Infection**

**Abstract**

**Backround:** Staphylococcus epidermidis are microorganisms most frequently isolated from prosthetic joint infection. The underlying pathogenesis of prosthetic joint infections is due to the ability of the microorganisms to forma biofilm. The biofilm provides protection against host immune responses and antimicrobial therapy, which has brought great difficulty to cure prosthetic joint infection. The strategies used to treat arthroplasty infectionsinclude one-stage or two-stage exchange procedures, removal of the prosthesis with or withoutarthrodesis, amputation, debridement and retention of the prosthesis (DAR), and chronic suppression. At present, the treatments of prosthetic joint infection are still higher recurrence rate, treatment for a long time and a large economic cost. So, the treatment of prosthetic joint infection is the orthopedic urgent problem to be solved.

Allicin has effects of antiinflammatory, anti-oxidation and regulate the immune function. The recent discovery of allicin can inhibit the formation of a variety of bacterial biofilm. But the exact mechanism is not clear. Bacterial adhesion and aggregationis a prerequisite for biofilm formation. The key material

In this process is the polysaccharide intercellular adhesion (PIA). At present, we

Do not know whether allicin interfere the *S. epidermidis* biofilm formation byPIA and its related gene expression. We hope to investigate this hypothesis, and to explore the mechanism of allicin to prevent thebiofilm formationof *S. epidermidis*. Allicin is already used in clinical application as a drug. If the anti-biofilm characteristics be confirmed by in vitro and in vivo, it will help allicin to apply in

Prosthetic joint infection (PJI) as an anti-biofilm drug.

7

##### **Part** Ⅰ

**Effect of Allicin on Staphylococcus Epidermidis Biofilm Morphology Objective:** Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of

Allicin against *S. epidermidis.* The *S. epidermidis* biofilm model is built by plate method. The *S. epidermidis* biofilm is evaluatedin the different concentrations of allicin by quantitative analysis and scanning electron microscopy (SEM).

**Method:** The mature biofilms are obtained byplate culture *S. epidermidis*for 24 hours**.** The biofilm morphology was observed by SEM. The amounts of biofilm are determined by crystal violet staining biofilm and reading at the wavelength of 590nm. The impactsin biofilm formation of *S. epidermidis* are assessed under different concentrations allicin.

**Results:** The MIC of allicin on *S. epidermidis*was 8 mg/L. the biofilm

Quantity with different concentrations of allicin intervention were 2.89±0.19 (saline group), 2.16±0.26 (1/8MIC allicin group), 1.55±0.16 (1/4MIC allicin

Group), 0.79±0.14 (1/2MIC allicin group), respectively, *P*﹤0.05. The SEM pictures showed thatonly a small amount of residual *S. epidermidis* was observed on the surface of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) material at 1/2MIC allicinintervention group, and biofilm was not found. but with the decline of allicin concentration, the biofilms were showed increase in theSEM

pictures.

**Conclusion:** The sub-inhibitory concentrations of allicin can effectively inhibit the *S. epidermidis* biofilm formation.

##### **Part** Ⅱ

**Effect of Allicin on Polysaccharide Intercellular Adhesion and it's Regulating Gene of Staphylococcus Epidermidis**

**Objective:** To explore the effect of allicin on PIA which is the main component of biofilm formed by S. epidermidis. Further to investigate the effect allicin on the

8

Expression of important genes for synthesis of PIA.

**Method:** Draw the curve of glucose and detection of PIA content by phenol-sulfuric acid method. The mRNA expression of genes which are important to the synthesis of PIA such as icaA、icaR、luxS and sigB were measured by RT-PCR.

**Result:** Glucose curve regression equation: Y=0.638X+0.036, R2=0.994. PIA content (µg/10mg) of the allicin treatment group and control group were 48.691±1.184 and 97.541±1.728, respectively, *P*﹤0.05; Bacterial dry weightwere

2.103±0.062 and 2.816±0.073, respectively, *P*﹤0.05; PIA content /Bacterial dry

Weightwere 307.241±14.563 and 393.215±17.835, respectively, *P*﹤0.05; The mRNA expression of icaA were 0.6310±0.0401 and 0.4084±0.0461, respectively, *P*

﹤0.05；The mRNA expression of icaR were 0.2826±0.0636 and 0.4253±0.0513, *P*

﹤0.05；respectively, The mRNA expression of luxS were0.1611±0.0481 and 0.3491

±0.0295, *P*﹤0.05；respectively, The mRNA expression of sigB were 0.5281±0.0395, respectively, *P*﹤0.05;

**Conclusion:** Sub-inhibitory concentrations of allicin can decrease the mRNA expression of positive regulation gene icaA and sigB and increase the mRNA expressinon of negative regulation gene icaR and luxS, which can reduce the production of PIA and inhibit the formation of the *S. epidermidis*.

##### **Part** Ⅲ

## **1. Effects of Allicin on the Staphylococcus Epidermidis Adhesion and Biofilm Formation on the Surface of Ultra-Highmolecular Weight Polyethylene and Titanium A11oy**

**2. Killing Effect of Allicin Combined with Vancomycin against Biofilm-Embedded Staphylococcus Epidermidis**

**Objective:** To investigate the effect of allicin on *S. epidermidis* adhesion and biofilm formation on the surface of UHMWPE and titanium alloy. The effects of allicin combined with vancomycin killing biofilm-embedded S. epidermidis were

9

observed

**Method:** The effects of allicin on *S. epidermidis* adhesion and biofilm formation on the surface of UHMWPE and titanium alloy were investigate by bacteria counting, quantitative experiments and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Both live and dead counts of the embadded-biofilm bacteria were estimated by the rapid epifluorescence staining method using the LIVE/DEAD®Bacterial Viability Kit.

**Result:** The number of bacteria adhering to the surface of UHMWPE per unit area were 8.05 ×10 4 CFU/mm2 (allicin concentration 0 mg/L group), 6.50 ×10 4

CFU/mm2 (allicin concentration 1 mg/L group), 5.63 ×10 4 CFU/mm2 (allicin

Concentration 2 mg/L group), 2.12×10 3 CFU/mm2 (allicin concentration 4 mg/L), respectively, *P*<0.05. The number of bacteria adhering to the surface of titanium alloy screw were 8.45 ×10 4 CFU/mm2 (allicin concentration 0 mg/L group), 5.78×10 4

CFU/mm2 (allicin concentration 1 mg/L group), 1.86 ×10 4 CFU/mm2 (allicin

Concentration 2 mg/L group), 7.07×10 3 CFU/mm2 (allicin concentration 4 mg/L), respectively, *P*<0.05. Absorbance of biofilm onUHMWPE surface were 4.38±0.55(allicin concentration 0 mg/L), 4.17±0.67 (allicin concentration 1 mg/L),

2.20±0.69 (allicin concentration 2 mg/L), 0.62±0.38 (allicin concentration 4 mg/L),

Respectively, *P*<0.05. Absorbance of biofilm on titanium alloy screw were 3.43±0.51(allicin concentration 0 mg/L),3.29±0.53(allicin concentration 1 mg/L),2.74±0.58(allicin concentration 2 mg/L),0.59±0.25(allicin concentration 4 mg/L), respectively, *P*<0.05. Embedded-biofilm *S. epidermidis* survival ratio is

14.81%(dead bacteria) and 85.19% (live bacteria) in normal saline intervention group, 21.74%(dead bacteria) and 78.26% (live bacteria) in allicin intervention group, 41.67%(dead bacteria) and 58.33% (live bacteria) in vancomycin intervention group, 83.33%(dead bacteria) and 16.67% (live bacteria) in allicin combined with vancomycin intervention group, respectively, *P*<0.05.

**Conclusion:** Thesub-inhibitory concentrations of allicin can inhibit the adhesion and biofilm formation of *S. epidermidis*on the surfaceof UHMWPE and titanium alloy

10

Materials. Sub-inhibitory concentration of allicin combined with vancomycin can kill embedded-biofilm*S. epidermidis.*

##### **Part** Ⅳ

**Build and EvaluateRabbit Model of Prosthetic Joint Infection Objective:** using New Zealand whiterabbits build prosthetic joint infection

Models and evaluate these models.

**Method:** The UHMWPE and titanium alloy prosthesis were implanted into New Zealand white rabbits knee, and different concentration S. epidermidis were inoculated into the articular cavity. All animal models were evaluated, and the optimal inoculated scheme was determined.

**Result:** When collecting samples, all animals survived. All rabbit's blood cultures were negative, and there were no other complications. Each group of animal body temperature during the experiment were 38.4±1.7℃（inoculate saline, groupA）, 38.9

±1.2℃（inoculate concentration 1×10 3 CFU/ml allicin, groupB）, 39.0±1.5℃,

(Inoculate concentration 1×10 4 CFU/ml allicin, groupC), 38.8±1.3℃（inoculate concentration 1×10 5 CFU/ml allicin, groupD）, respectively, *P*> 0.05. The number of wound dehiscence or redness cases were 0 (group A), 1(group B), 1(group C),

3(Group D), respectively. Both knee soft tissue and prosthetic infection rates were 0%in groupA. Both knee soft tissue and prosthetic infection rates were 100%in groupC and D. Knee soft tissue and prosthetic infection rates were 25% and 37.5% in group B, respectively.

**Conclusion:** New Zealand white rabbits wereimplanted of UHMWPE washers and titanium alloy screws in knee and inoculated with 1mL 104CFU/mL*S. epidermidis*, the biofilm can be stably form at the implanted material surface. The prosthesis joint infection animal model wassuccessful building with this method.

##### **Part** Ⅴ

**Efficacy of Allicin plus Vancomycin Lavage for Rabbit Prosthetic Joint**

11

**Infection Caused by Biofilm-forming Staphylococcus Epidermidis Object:** Using Sub-inhibitory concentration allicin combined with vancomycin

Lavage PJI model joint cavity to observe its effect on the biofilm and bacteria.

**Methods:** We created 32 rabbit models of a Staphylococcus epidermis PJI, which were divided into 4 groups based on the fluid used to lavage the infected joint: normal saline, allicin, vancomycin, or allicin plus vancomycin. Structural changes of the biofilm on the surface of the implanted washers were observed by SEM. The number of viable bacteria within the biofilm of the implanted screw and in the periarticular soft tissues was measured.

**Results:** Scanning electron microscopy images showed a large number of biofilm and bacterial accumulation in saline lavage group, more biofilms and some biofilm-embadded bacteria in vancomycin lavage group, fewer biofilm and a large number of bacteria in allicin lavage group, almost no visible biofilm and sporadicbacterial in allicin combined with vancomycin lavage group. Bacterial counts

(Log10CFU /mL) of screw ultrasonic eluent were 4.94±0.72 (saline lavage, group A),

4.13±0.95 (vancomycin lavage, group B), 4.45±0.63 (allicin lavage, group C) and 2.88±0.56 (allicin combined with vancomycin lavage, group D), respectively, *P*<

0.01. Soft tissue bacterial counts (log10CFU /mL) were 4.90±0.79 (group A), 4.49±

0.74 (group B), 4.01±0.77(group C), and 3.85±0.96 (group D), respectively. The difference ingroup A vs groupB, group A vs group D have, *P*<0.05. There were no statistically significance difference in group B vs group D and group A and groupC

**Conclusions:** Lavage with allicin inhibited biofilm formation. Intra-articular allicin plus vancomycin is a promising new strategy to treat PJI.

**Key words**: Allicin; Biofilm; Artificial joint; Infection; Prosthesis; UHMWPE;

Titanium alloy; Staphylococcus Epidermidis

12

**大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜的影响及在人工关节感染治疗中的应用**

前 言

人工关节的出现极大地改善了很多终末期关节疾患人群的生活质量[1]，其理想的手术效果也使得人工关节置换的适应症逐渐扩大[2]。在美国，2010有大约

33.2万全髋关节置换和71.9万全膝关节置换手术[3]。在欧洲也有大量的行髋关节和膝关节置换手术的病人[4]。随着人工关节置换数量的增加，发生人工关节假体感染（Prosthetic Joint Infection, PJI）的数量也必然增加，有数据统计显示，从2001年到2009年，美国髋关节置换术感染已经从4545例上升到7162，膝关节置换后感染数从7113上升到14802[5]。PJI给患者家庭和社会带来巨大的经济负担，美国卫生保健系统在2009年治疗PJI的总花费是5.66亿美元，这一数字到2020年预计将在16.2亿美元左右[5]。我们目前尚没有相关统计数字出现。

人工关节置换关节手术已经成为关节外科的一种常见的手术，也是一个非常成功的手术，它能够显著提高终末期关节疾患患者的生存质量。在未来20年对该手术的需求将会显著增加[6]。人工关节置换手术数量的增加，以及人口老龄化及免疫低下人群的出现等因素，作为条件致病菌的表皮葡萄球菌导致的生物膜相关人工关节感染呈现逐年上升趋势[7-9]。其感染途径可以是手术本身引起，也可能是由于血源性的播散导致，至今尚无药物能有效控制此类感染，一旦发生细菌生物膜感染，难以彻底治愈。目前的PJI治疗手段包括长时间抗生素抑制慢性感染、手术清创保留假体、一期关节假体置换、二期关节假体置换、关节融合术、关节切除成形术和截肢术，每个方案都有各自的优缺点和并发症，具体采用何种手段来治疗PJI需要根据病人的具体情况。但PJI治疗总的特点是破坏性大、治疗时间长、复发率高、经济负担重。造成了额外的医疗费用和大量的医疗资源浪费[10]。虽然也有清创并保留假体的治疗方案，但由于原有假体表面生物膜的存在，且生物膜内的细菌不能被彻底杀灭，常常导致治疗失败，感染复发的比例高，而严重病例需要行关节融合术甚至截肢。

PJI属于内植入物相关感染，这类感染灶的病原微生物有两种存在形式：自

13

由浮动（浮游）或附着于材料表面（固着）。这两种形式可同时存在且并不相互排斥。但这些致病微生物大部分是以粘附在材料表面的形式存在，它们彼此间有着相互联系并长期驻留在生物膜内。这种存在形式不仅使得检测非常困难，还往往导致治疗失败，除非将植入生物材料的离体，否则很难将其从体内彻底清除，所以内植物的生物膜类型感染是一种慢性或长期的复发性的感染[11]。PJI是骨科领域常见的生物膜型感染，其发病的主要机制是病原体容易粘附于假体表面并产生生物膜，生物膜增强了微生物对抗生素的耐药性和更有效地对抗宿主的免疫系统的防御，这些产生生物膜的微生物细胞间存在通讯系统，调节细菌的各种生理过程和对抗生素的耐药性[12, 13]，使得生物膜内的细菌长期成活，并周期性地自生物膜内释放出来，引起感染扩散和复发。

表皮葡萄球菌正常情况下寄生在人类皮肤、呼吸系统和消化道粘膜的表面，其致病性与其形成生物膜密切相关[14]。在引起急性PJI病原菌中表皮葡萄球菌位列第二位，而在迟发型和慢性PJI中，它位列第一位[3]。革兰氏阴性菌单独引起的PJI的发生率大约在10%左右[15]，其他微生物包括肠球菌、链球菌和真菌也有报道。

表皮葡萄球菌引起PJI主要是依靠其粘附特性定植在医疗植入的高分子材料表面形成多层浓厚的生物膜[14, 16, 17]，导致生物膜病（biofilm associated

disease）的发生。因生物膜中细菌对抗生素的耐药性及抵抗机体免疫清除能力的增加[18]，致使PJI临床上呈现相对静止期和急性发作期以及易复发的特性。当细菌粘附在高分子材料表面并形成生物膜后，在临床上可以表现为相对静止期，这时没有明显的临床症状或仅有轻微的疼痛。但在身体抵抗力下降时，也可以表现出急性感染症状。这时使用抗生素可以抑制或杀死从生物膜中释出的浮游细菌而抑制感染症状，但不能清除假体表面细菌生物膜内的细菌，一旦抗生素治疗停止，细菌生物膜就会作为感染复发的“疫源地”，细菌可不断自生物膜中释放入血而导致反复感染发作。

细菌生物膜的形成大致可分为四个阶段：粘附、聚集、成熟和脱落。细菌粘附至人体基质蛋白或高分子材料表面后，通过聚集因子集聚，增值形成微菌落。此过程中涉及多种聚集相关因子的参与。对于葡萄球菌而言，PIA是介导聚集的

14

最重要因子。PIA亦称聚N-乙酰葡萄胺，是革兰氏阳性细菌生物膜基质网的重要组成成分，凝固酶阴性的表皮葡萄球菌有合成PIA的能力，它与肽聚糖共同形成生物膜的重要组分——粘质。粘质的合成是表皮葡萄球菌造成体内植入的假体、导管、瓣膜等感染的必要过程[19]。PIA是由ica操纵子编码的酶蛋白催化合成，表皮葡萄球菌ica操纵子包含一个调节基因icaR，4个功能基因（icaA、icaD、

icaB和icaC），icaR调节4个功能基因的转录，参与内部和外部因素等对表皮葡萄球菌生物膜形成的影响。

大蒜素（二烯丙基硫代亚磺酸酯）是一种来源于大蒜的硫化物，它具有抗菌

[20]、抗真菌[21]和抗寄生虫[22]作用。一般认为大蒜素的作用机制是使酶的半胱氨酸残基上的SH基团失活[20, 23]。有研究表明大蒜素抑制表皮葡萄球菌[24]、白色念珠菌[25]、铜绿假单胞菌[26]生物膜的形成。生物膜在形成的过程中首先粘附在植入材料的表面，PIA是细菌粘附的主要因素[27]，有文献指出，硫氢基化合物可以降低金黄色葡萄球菌PIA产生并进一步其生物膜的形成[28]。基于上面的研究成果，我们希望通过实验观察大蒜素是否可能通过抑制PIA合成而使得细菌丧失粘附和积累能力、大蒜素对于PIA相关基因是否存在影响及它如何干预生物膜的形成的。

病原菌主要通过两种机制导致PJI的发生，一是手术过程中病原菌接种到假体上，另一种是手术之后血源性转移种植到假体上[29]。当致病微生物粘附在假体上后，其表型发生变化，成为无柄细菌形式并分泌细胞外基质，细菌和细胞外基质组成生物膜[30]。生物膜的存在对PJI的诊断和治疗有着深远的影响。

PJI有许多分类系统。按照PJI发生的时间可分为：早期（手术后3个月内发生）、延迟（手术后3-24个月内发生）、慢性（手术后大于24个月发生）。血源性假体感染可能发生在任何时间点，更多的可能是在手术后24个月出现[29, 31]。早期PJI通常发生在手术后病人伤口出现并发症的情况下，延迟性PJI和慢性

PJI通常出现缓慢加剧的人工关节疼痛。血源性PJI常常在人工关节使用数年之久没有任何问题的情况下发生，这与其它部位感染有关[32]。

要成功治疗PJI必须消灭生物膜内微生物，同时保留良好的关节功能和生活质量，治疗人工关节假体感染的方案有一期置换或二期置换、截肢、清创术并保

15

留假体(debridement and retention of the prosthesis, DAR)以及长期抗生素抑制。上述策略中DAR方案满足了病人对于PJI治疗要求（治疗时间短，花费小），但其复发率也较高[32]。目前还没有随机临床试验比较各种治疗策略，国际上没有一致认可的PJI治疗指南，另外，北美和欧洲的治疗也有着差异[29]。选择何种治疗方案应该考虑到一些基本因素，如症状持续时间，植入物的稳定性，患者并发症和感染的类型微生物[32]。

置换需要移除感染的假体和所有的外源性材料，包括骨水泥，切除失活的软组织和骨，在移除感染假体的同时植入新的假体，即为一期置换，经过一段时间的抗生素治疗后，再植入新的假体，此为二期置换。在二期置换间期，植入骨水泥（有或没有抗生素浸渍）间隔，用来帮助维持肢体长度、辅助运动。在一些情况下不主张使用骨水泥间隔，包括一些“难以对付”的病原微生物引起的感染，包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、肠球菌、对多种抗生素耐药的细菌和真菌引起的感染[29, 33]。对于二期置换从切除感染假体到重新植入假体的时间间隔为半年

左右，而对于那些“难以对付”的微生物感染则需要更长时间[29, 32]。先前的研究已经暗示一期置换的失败率高z于kq二期201换60, 1然18而，这些研究常为回顾性、单中

心、样本少。近期来源于大量注册系统和文献系统评价比较一期和二期置换得出的混杂的结论[34-36]，也就是说，两者孰优孰劣依然不知道。置换手术是治疗迟发性PJI、慢性PJI和假体松动的标准策略[29, 32]，对于一般的感染，一期或二期置换手术后，应用抗生素治疗持续时间为3个月；对于二期置换手术治疗“难以对

付“的病原微生物，专家意见建议6周的抗生素治疗和再植假体手术进一步推迟

## 2 周，此时多个术中获得微生物标本进行培养，针对培养结果，再应用抗生素治

疗3个月[32]。从上面的治疗方案中可以发现针对假体表面的生物膜的产生目前临床采用移除假体的方法，但这一过程耗时常，病人经历多次手术。另外我们可以发现，在目前的治疗方案中没有药物抗生物膜治疗。

在所有的治疗方案中，DAR策略是患者容易接受的治疗方案，该方案治疗时间短，花费少。DAR治疗方案包括关节清创，切除感染和坏死组织，更换人工关节衬垫和关节灌洗等联合治疗[32]，但DAR策略的复发率很高[37]，在慎重选择病人和使用能够抗生物膜内菌（例如利福平、喹诺酮类抗生素）的抗生素后，DAR

16

的疗效有了非常显著提高[29, 32]。DAR策略中抗生素治疗的持续时间尚未统一，有专家意见建议对髋关节PJI使用3个月抗生素，对膝关节PJI使用6个月抗生素。最近的研究报告，对患者治疗3 - 6个月和6个月以上的抗生素，其治疗结果类似[38]。

通过研究抗生素生物膜内的抗菌活性，发现不同抗生素具有不同的功效。利福平和喹诺酮类药在生物膜内具有良好的活性[39, 40]，在治疗葡萄球菌引起的PJI

（特别是采用DAR策略），利福平是治疗的主要药物[32]，利福平的体外试验有效性结果也已得到临床研究的支持。利福平和喹诺酮类抗生素组合的抗生素治疗是成功治疗葡萄球菌PJI的独立预测指标，使用利福平的主要限制是在单独使用利福平是容易产生抗生素抵抗作用，也就是说，利福平不能作用一线药物使用[41]。利福平的这一特点可能与它更易穿过生物膜的特性有关。氟喹诺酮类耐药性葡萄球菌越来越多，这限制了利福平-喹诺酮类抗生素组合的效用[42]，选择与利福平组合的药物包括夫西地酸、甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲恶唑或米诺环素[32, 41, 43, 44]；新

的药物，如达托霉素和利奈唑胺临床研究的结果是喜忧参半[45, 46]。这些药物只是作为与利福平联合使用的一部zk分q，而20不16是0单11一8使用的药物[45, 47]，目前还没有

临床研究比较不同药物与利福平联合使用的疗效，除了葡萄球菌PJI，体外实验证明利福平还能抵抗痤疮丙酸杆菌和肠球菌生物膜[48, 49]。对于革兰氏阴性感染，动物模型实验证明环丙沙星是有效的，然而关于此类病原菌的临床数据非常少

[40]，革兰氏阴性感染治疗结果差异很大，特别是DAR的治疗成功率从27到94%[50，

51]，特别需要关注的是，很多革兰氏阴性菌有诱导产生对喹诺酮类药物产生抵抗

作用，尤其是铜绿假单胞菌菌。据此，专家推荐在开始应用喹诺酮类药物治疗前使用2-4周的β-内酰胺抗生素，以减少可能产生的抵抗作用[32]。在白色念珠菌引起的PJI，新的证据表明卡泊芬净比氟康唑在生物膜内有更好的活动[33, 52]。

目前的临床治疗PJI方案尚没有开展针对生物膜的治疗，因为现有的抗生物膜策略均处于实验阶段。找到理想的抗生物膜药物对于PJI的治疗具有重大意义。鉴于体外实验发现大蒜素具有抑制表皮葡萄球菌粘附和聚集作用，进而阻止生物膜的形成[53, 54]。我们将大蒜素作为一种潜在的抗生物膜药物，希望通过体外实验，观察大蒜素对表皮葡萄球菌在人工关节材料（UHMWPE和钛合金）表面粘附

17

和生物膜形成的影响，观察大蒜素联合万古霉素对于人工关节材料表面生物膜内菌的杀灭作用；建立人工关节动物模型，通过在体动物实验，利用大蒜素联合万古霉素灌洗感染的人工关节，观察假体表面生物膜形态结构的变化和对生物膜内菌杀灭作用。如果大蒜素能够作为临床使用的抗生物膜药物，将其应用到治疗

PJI的DAR方案中，对于临床人工关节感染的治疗具有重要的意义。

我们实验的内容：第一部分观察大蒜素对表皮葡萄球菌（ATCC35984）生物膜（biofilm BF）结构的影响，利用生物膜半定量的方法观察不同浓度大蒜素干预后表皮葡萄球菌生物膜密度的改变，同时利用扫描电子显微镜观察生物膜形态变化。第二部分是研究大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜形成过程重要因子PIA及其相关基因的表达的影响。第三部分是研究大蒜素对于表皮葡萄球菌在UHMWPE和钛合金粘附的影响，及大蒜素联合万古霉素对于表皮葡萄球菌生物膜内细菌生存状况的影响。第四部分是利用新西兰白兔建立表皮葡萄球菌引起的人工关节感染模型，确定适宜的接种菌量。第五部分是利用UHMWPE和钛合金材料制作兔人工关节假体感染的动物模型，实施大蒜素联合万古霉素灌洗动物模型，评估对关节

周围软组织和假体表面进行细菌z、kq生物201形60成11的8影响。

18

# 第一部分 大蒜素对表皮葡萄球菌Th物膜形态结构的影响

表皮葡萄球菌和其它一些凝固酶阴性葡萄球菌过去被认为是无害的，它们是很少引起疾病的寄居人体皮肤上的共生菌[55, 56]，但是，表皮葡萄球菌已经是当今院内感染的重要病原菌[57]，很多假体植入装置和血管内导管的感染均与它们密切相关[58]。现在人们已经认识到表皮葡萄球菌粘附到植入材料的表面和形成生物膜是其致病的主要发病机制[59]，而生长在生物膜内的细菌比浮游细菌具有更强的对抗生素的抗药性[60]。

自古以来大蒜在医学上的作用便被人们知晓，从大蒜中提取的有机硫化物--蒜素是其有效的活性成分，分子式：C6H10OS2，分子量：162.27，化学结构式见图1-1。它具有强效的抗癌、抗氧化和增强免疫调节活性和抗微生物等广泛的生物学特性[61-64]，有研究表明大蒜素能够抑制表皮葡萄球菌、绿脓杆菌、放线菌细菌生物膜的形成[26, 53, 65]。大蒜素对生物膜的抑制作用无疑对于临床的植入物感染有着重要的意义。本研究通过z对k生q物2膜01定6量01检18测和利用扫描电子显微镜观察不

同浓度的大蒜素在体外对表皮葡萄球菌生物膜形成和形态的影响。



## **1.** 材料与方法

### 1.1 菌株、试剂、仪器

#### 1.1.1 实验菌株

19

表皮葡萄球菌RP62A ( ATCC35984)购自美国国家标准菌种保藏中心

#### 1.1.2 药物及主要试剂

大蒜素标准品（产品编号CDDM-A543500-1mg）购于广州药物研究所胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)购自青岛海博生物科技有限公司

#### 1.1.3 主要仪器和材料

96孔培养板 美国Costar公司

3.5cm细胞培养皿 美国Costar公司比浊仪 德国Siemens公司

UHMWPE垫圈（外径8mm，内径3.5mm，厚度1.2mm）广州奥特工程塑料有限公司加工

微量移液器（不同规格）德国Eppendorf公司

超净台(ZHJH-C2109B/C2112B)上海智城分析仪器制造有限公司

CO2 控制细胞培养培养箱 瑞士Adolf Kuhner公司FlexStation 3多功能酶标仪 美国Molecular Devices公司

扫描电子显微镜(JSM-IT300zk型q)日20本160日11本8电子公司

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大蒜素对表皮葡萄球菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory

concentration，MIC）的测定：采用微量稀释法测定大蒜素对表皮葡萄球菌的MIC。

①药物储备液的配制：大蒜素制成储存浓度200mg/L。

②用蒸馏水将大蒜素的储存浓度稀释至相应的初浓度（l0倍于实验的终浓度），即大蒜素的初浓度分别为160mg/L、80mg/L、40mg/L、20mg/L、10mg/L。

③按照NCCLs20O3版推荐的微量肉汤稀释法操作标准进行实验操作。设置药物空白和菌株空白对照孔。吸取上述稀释后的药物初浓度10µL分别加入到96孔微量接种板孔内，每孔最终含不同药物浓度的MHB100µL。

④浓度相当于0.5麦氏比浊标准的表皮葡萄球菌的菌悬液，经MH肉汤1∶

1000稀释后，向每孔中加100µL。

⑤将上述96孔板密封后置35℃温箱孵育24h,肉眼观察结果。参照CLSI20O6版抗菌药物的方法判定MIC结果。

20

#### 1.2.2 结晶紫(crystal violet)液配制：将结晶紫乙醇饱和液（结晶紫2g溶于

20mL95%乙醇中）20mL和1%草酸铵水溶液80mL两液混匀置24h后过滤，室温保存备用。

1.2.3磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution, PBS）配制：称取NaCl 8g, KCl 0.2g, 1.44g Na2HPO4和1.8g K2HPO4，溶于800 ml蒸馏水中，用HCl调节溶液的pH值至7.4，最后加蒸馏水定容至1 L. 保存于4℃冰箱中备用。

#### 1.2.4 生物膜培养及大蒜素处理方案：在96孔板内加入100µL浓度为

104CFU/mL表皮葡萄球菌，经37℃,220rpm振荡培养24小时，获取成熟的生物膜。试验分为四组，分别加入1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC大蒜素0.1mL和0.1mL生理盐水作为照组。

#### 1.2.5 生物膜定量分析：将在粘附有成熟的生物膜的96孔板分为4组，每组12孔，各组分别加入1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC浓度的大蒜素0.1mL和0.1mL生理盐水，静置培养24小时后将96孔板中的液体倒掉，以除去悬浮状态生长的细菌，用生理盐水洗去粘附的细菌，重复3次，加入2%结晶紫(200µL/孔)染色

10min，再生理盐水缓慢冲洗培z养kq板，20直1至60流11水8无色，干燥后用酶标仪在波长

570nm下测量紫外吸收光OD570，重复3次，记录平均值。

#### 1.2.6 扫描电子显微镜观察:取浓度为104CFU/mL表皮葡萄球菌（ATCC 35984）菌液3mL，加入到含有TSB培养基的35mm的培养皿中,培养皿中放置UHMWPE垫圈，让垫圈上附着生长的生物膜，经过37℃静置培养24小时后,加入不同浓度的大蒜素1mL，分4组分别为:(1)未处理对照组；(2) 1/2MIC大蒜素组；(3) 1/4MIC大蒜素组；（4）1/8MIC大蒜素组，再经过37℃静置培养24小时后取出垫圈，标本处理过程如下：

①磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)缓慢冲洗2遍，去除浮游细菌。

②放置4℃预冷的2%戊二醛浸泡固定2小时。

③30％、50％、70％、90％、100％乙醇梯度脱水（100％浓度2次，其余浓

度各1次，每次15分钟）。

④离子溅射仪喷金。

21

⑤逐个进行SEM观察，随机选取视野并拍照。

#### 1.2.6 统计学分析

实验数据用均数±标准差( *x*±s)表示，应用SPSSl9.0软件对相关数据进行单因素方差分析，组间两两比较用Bonferroni法进行，对于方差不齐同的组间比较用Welch法进行分析，以*P*＜0.05认为有统计学意义。

## **2.** 结果

### 2.1 大蒜素对表皮葡萄球菌的最小抑菌浓度：大蒜素对表皮葡萄球菌的最低抑菌浓度（MIC）8mg/L

### 2.2 不同浓度的大蒜素对生物膜的影响: 在96孔板内加入不同浓度的大蒜素的表皮葡萄球菌生物膜经过24小时培养，经结晶紫染色后，用酶标仪检测在波长570nm处的紫外吸收光0D570值(该值反应生物膜的量,其值越大,表明吸光度越大,生物膜的量也越大)。各组检测结果：2.89±0.19（生理盐水组）、2.16

±0.26（1/8MIC大蒜素组）、1.55±0.16（1/4MIC大蒜素组）、0.79±0.14（1/2MIC大蒜素组），生理盐水组干预后生物膜的量最大，加入亚抑菌浓度大蒜素后生物膜量下降的最多，随着大蒜素浓度的增加，生物膜的含量逐渐减少。各组间差异有统计学意义(*P*﹤0.05)。图1-2

3.5

3.0

2.5

2.0

**吸光度** （570nm）

1.5

1.0

.5

0.0

**图1-2** **生物膜量改变（吸光度）**

图1-2 不同浓度大蒜素干预后生物膜量的改变，生理盐水对照组生物膜的吸光度为2.89

±0.19, 1/8MIC浓度的大蒜素干预组生物膜的吸光度为2.16±0.26, 1/4MIC浓度的大蒜素干预组生物膜的吸光度为1.55±0.16, 1/2MIC浓度的大蒜素干预组生物膜的吸光度为

22

0.79±0.14，随着大蒜素干预浓度的增加，生物膜的含量逐渐减少。各组间差异有统计学意义，*P*﹤0.05。

### 2.3 扫描电子显微镜观察在不同大蒜素浓度下的生物膜变化

由图1-3可见，使用1/2MIC浓度的大蒜素干预后（图1-3a），在UHMWPE材料表面仅残留少量的表皮葡萄球菌，没有明显的生物膜发现，可清晰发现UHMWPE材料。而随着大蒜素浓度的下降，生物膜逐渐增多，并可见被包裹在生物膜中的表皮葡萄球菌，图像中生物膜与细菌呈现混杂状态，UHMWPE材料被覆盖（图1-3b、图1-3c），在生理盐水组，大量的生物膜存在，将表皮葡萄球菌包裹在其中，由于生物膜的含量过于浓密，被包裹在其中的表皮葡萄球菌反而难以发现（图



1-3d）。因为样品在电子扫描显微镜观察前经过淋洗，浮游菌已经被清除，图中细菌是由于生物膜的存在才得以继续停留在UHMWPE材料的表面。

图1-3不同浓度大蒜素干预后SEM观察图，1/2MIC浓度的大蒜素干预后（图1-3a），在UHMWPE材料表面残留少量的表皮葡萄球菌，没有明显的生物膜发现；在1/4MIC 和

1/8MIC浓度的大蒜素干预下，可见被包裹在生物膜中的表皮葡萄球菌，生物膜与细菌呈现混杂状态（图1-3b、图1-3c）；在生理盐水干预组，大量的生物膜存在，表皮葡萄球菌包裹在其中（图1-3d）。

## **3.** 讨论

实验结果显示在亚抑菌浓度的大蒜素干预下，表皮葡萄球菌产生的生物膜量显著减少，随着干预的大蒜素浓度的降低，生物膜含量增加，在生理盐水干预组，生物膜含量最多。UHMWPE垫片进行电子扫描显微镜观察，在1/2MIC浓度的大蒜

23

素干预下，扫描电镜图片上仅有少量的细菌，几乎没有生物膜，而在1/4MIC 和

1/8MIC大蒜素干预下，扫描电镜图片可见到生物膜和较多的表皮葡萄球菌混杂存在，而作为对照的生理盐水干预组，扫描电镜图片上可见大量的生物膜，呈现堆积状态，并且掩盖了表皮葡萄球菌。上述实验结果充分表明亚抑菌浓度的大蒜素具有降低表皮葡萄球菌生物膜的特性。

生物膜是细菌依附于载体表面由胞外多聚物和基质网包被的微生物聚合物，它具有高度组织化和系统化。与单个处于浮游状态的微生物不同，这些在载体表面增值的微生物群体表现出新的生物学特性，具有更强的适应外界环境的能力。这些生物学特性可以导致微生物产生抗药性和难以治疗的感染的发生。葡萄球菌生物膜的形成发展过程大致可以分为粘附、聚集、成熟、脱落（或传播）四个阶段[66]。一个成熟的表皮葡萄球菌生物膜由多种粘附分子，包括PIA,蛋白质（Bhp，

Aap和Embp）、磷壁酸和细外DNA，目前对于葡萄球菌生物膜的成熟度尚无明确定义，只是根据培养时间决定细菌生物膜的成熟情况，一般情况下培养24小时以上的葡萄球菌生物膜为成熟生物膜，30小时细菌生物膜开始蹦解。生物膜成熟后，细菌合成的酚溶性调节肽等物质，可能介导细菌从生物膜脱落，进入血液，引起菌血症或其他部位的感染。相比浮游细菌，抗菌药物对于生长在生物膜内的细菌只能发挥极弱的抗菌作用。因此许多化合物被用来研究是否可以减少生物膜形成。例如水杨酸和氨溴索就具有抑制生物膜产生的作用[67, 68]。

大蒜素属于天然药物，具有抗炎、抗氧化和调节机体免疫功能等多项作用。人们普遍承认，蒜素通过与含有巯基的酶发生氧化反应来实现其抗菌作用[69, 70]，碘乙酰是另一种含有巯基的酶的抑制剂，具有抑制生物膜的作用，另外，硫氢基化合物通过抑制PIA的产生来阻止金黄色葡萄球菌生物膜的形成[28]。也有文献报道，大蒜素具有通过抑制细菌密度信号感应系统来阻止铜绿假单胞菌生物膜形成[71]和抑制白色念珠菌生物膜的形成[25]。但是目前对于大蒜素抑制生物膜产生的机制并不了解。用大蒜素处理的表皮葡萄球菌样品中PIA显著降低[54]，这一发现预示着大蒜素有可能是抑制PIA合成，进而阻止表皮葡萄球菌的粘附和聚集，并最终抑制生物膜的形成。在天然药物中，还有其它一些药物也具有抗生物膜的作用，例如黄芩素具有抑制白色念珠菌[72]和铜绿假单胞菌生物膜形成的作用[73]。

24

尽管发现了一些天然药物具有抗生物膜的作用，但对于天然药物抗生物膜的具体机制尚不清楚。

总之，亚抑菌浓度大蒜素干预后的表皮葡萄球菌生物膜显著降低，粘附在

UHMWPE垫圈表面的表皮葡萄球菌显著减少，大蒜素通过什么途径影响表皮葡萄球菌的生产，需要进一步实验来探究。

25

**第二部分大蒜素对表皮葡萄球菌多糖粘附素及其**

# 调控基因的影响

表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)是寄居在人体皮肤、黏膜表面的一种常见的条件致病菌。在表皮葡萄球菌生物膜形成过程中，细胞间多糖粘附素（polysaccharide intercellular adhesin, PIA）亦被称为聚N-乙酰葡萄糖胺，PIA是存在于细胞表面的长达130个糖基的β-1, 6-2-脱氧-2-氨基-D-吡喃葡萄糖链，其中＞80%的残疾去乙酰化，它在细胞间粘附和聚集中发挥主要作用的部分[74]。PIA是表皮葡萄球菌生物膜的重要组成部分，与肽聚糖共同形成生物膜结构中最重要的组分—粘质。PIA在生物膜的形成过程中作为细胞间粘合剂[75]，

PIA的分子结构使得细菌粘附到极性疏水表面，并在部分去乙酰化后形成的氨基基团，使其具有了阳离子性质的活性，通过绑定到表面带负电的细菌可以促进细胞间相互作用[76]，PIA的合成取决于icaADBC操纵子的表达, icaADBC编码三个具有酶活性的膜蛋白(IcaA, IcaD, 和IcaC)和细外蛋白质(IcaB)[74]，由icaA操纵子编码的酶蛋白是主要的催化合成PIA的酶，icaR位于icaADBC基因的上游，能表达出转录抑制蛋白，其核心作用是高效的负调节ica操纵子的转录[77]。luxS是细菌硫代谢中参与甲基循环的代谢酶之一，催化合成Autoinducer-2(AI-2)。AI-2是信号分子，研究发现lux QS系统在表皮葡萄球菌生物膜的形成中起到负调控的作用，它对表皮葡萄球菌的调控与ica操纵子依赖性通路有关[78]。

在经过亚抑菌浓度大蒜素干预后，表皮葡萄球菌产生的生物膜显著减少，这是否存在和PIA的关联并不清楚。我们通过大蒜素干预后PIA的变化，与对照组进行比较进行观察研究。

## **1.** 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验菌株

表皮葡萄球菌RP62A ( ATCC35984)购自美国国家标准菌种保藏中心

26

#### 1.1.2 药物及主要试剂

大蒜素标准品（产品编号CDDM-A543500-1mg），购于广州药物研究所胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)，购自青岛海博生物科技有限公司 pH7.4磷酸盐缓冲溶液，自行配制（见第一部分）

无水乙醇，广州市俱辉化工有限公司浓硫酸，韶关市威博化工有限公司重蒸酚，北京索莱宝科技有限公司

PrimescriptR RT-PCR Kit, 日本Takara公司TRIzol®Reagent 美国invitrogen公司

异丙醇，广州中南化工

三氯甲烷，深圳市华丰源化工有限公司葡萄糖，广东光华科技有限公司

#### 1.1.3 仪器

24孔细胞培养板，方野科技发展有限公司

高分子聚乙烯垫片，广州奥特工程塑料有限公司加工紫外可见分光光度计，上海奥析科学仪器有限公司

TH-300BQE型数控超声波清洗器，济宁天华超声电子仪器有限公司Xo-400SD多频超声波细胞粉碎仪，南京先欧仪器制造有限公司

Alpha 1-2 LD plus冷冻干燥机，德国Marin Christ公司普通PCR仪，杭州朗基科学仪器有限公司

凝聚成像系统，上海领成生物科技有限公司电泳仪制冰机AF100 Scotsman（思科特曼）

低温离心机 胜创生物科技有限公司微型振荡器 海门市麒麟医用仪器厂

### 1.2 方法

#### 1.2.1 葡萄糖标准曲线绘制

精密称取在105℃下干燥至恒重的葡萄糖0.1000g于100mL容量瓶中，加蒸馏水溶解至刻度，分别精密移取该溶液0.4mL、0.8mL、1.2mL、1.6mL、2.0mL、

27

2.4 mL于10mL具塞比色管中，补加蒸馏水至2mL，分别加入6%苯酚溶液1.0mL和浓硫酸5.0mL（缓缓加入），静置5min，定容至10mL，摇匀。80℃水浴加热15min，冷却至室温，静置30min。以蒸馏水同法作空白参比，在490nm处测吸光度（A）。以葡萄糖浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

#### 1.2.2 平板法构建体外模型

挑取表皮葡萄球菌RP62A单菌落接种于TSB培养基中，37℃，180rpm振摇培养过夜。用分光光度计将菌液的A600值调整至0.5。接种菌液于的24孔细胞培养板中（每个孔中预先放置超高分子聚乙烯垫片，作为生物膜生长的载体），每孔1ml，37℃培养24h之后在灭菌高分子聚乙烯垫片上形成成熟生物膜。

#### 1.2.3 实验分组及表皮葡萄球菌生物膜PIA的提取

实验分为生理盐水对照组和亚抑菌浓度大蒜素干预组，通过以上方法得到成熟生物膜后，在24孔板中加入TSB培养基和浓度为4µg/ml大蒜素各1ml，重复32孔，4孔为一组，共8组。对照组加入TSB和生理盐水个1mL，同样重复32孔，4孔为一组，共8组，37℃孵育24h后取出高分子聚乙烯垫片，用灭菌PBS液冲洗2次，将高分子聚乙烯垫片分别置于2ml生理盐水中超声

20min，离心(4000rpm, 30min)。细菌沉淀冷冻干燥后称取细菌干重。上清液中加入无水乙醇提取 PIA。

#### 1.2.4 PIA含量测定（硫酸-苯酚法）

各组的样本按照相同的方法进行显色，测定其OD490值。根据标准曲线并结合标准曲线回归方程由测得的OD490值，计算出各个样本中相应的多糖含量。

#### 1.2.5 RNA的提取

分为生理盐水对照组和亚抑菌浓度大蒜素组。按照上述方法获得成熟生物膜后，在24孔板中加入TSB培养基和大蒜素（浓度为4mg/L）各1mL，每组12孔。在37℃下孵育24h，取出玻片，用灭菌PBS液淋洗2次，将高分子聚乙烯垫片放置于2mL生理盐水中，超声洗脱仪洗脱25min。

①细菌的裂解：将洗脱的菌液移至离心管中，在4℃高速离心10min后，弃上清液，保留沉淀物，每管中加入5 ml Trizol溶液，混匀成均一混合物。室温放置5min。

28

②加入0.1倍体积的氯仿，振荡混匀15s，室温下放置3 min。4℃12, 000

×g离心15 min。

③小心吸取上层透明水相放入用DEPG睡处理过的无菌管中，加入预冷的异丙醇2.5ml，混匀，室温静置10min。4℃12,000×g离心15 min，弃上清。

④将沉淀用预冷的75%乙醇洗涤，除去乙醇，室温下干燥。

⑤用DEPG处理过的水溶解RNA样品，60℃水浴15min。冷却置-80℃冰箱中保存备用或直接进行RT-PCR。

#### 1.2.6 Template RNA变性及反转录反应

①配制下列反应混合液。试剂 使用量

dNTP Mixture 1µl

Random 6 mers 1µl

Template RNA 1µl RNase Free dH 8µl

②在PCR仪上进行变性、退火反应。65℃5 min.

4℃

③在上述反应管中配制下列反转录反应液。试剂 使用量

上述变性、退火后反应液 10µl 5×PrimeScript Buffer 4µl

RNase Inhibitor(40 U/μl) 0.5µl PrimeScript RTase 0.5µl RNase Free dH2O 5µl

④ 在 PCR 仪上按下列条件进行反转录反应。 30℃ 10 min

42℃ 25 min

95℃ 5 min

29

4℃

#### 1.2.7 PCR反应：

①按下列组成配制PCR反应液：10×PCR BufferⅡ5μl

dNTP mixture 2μl

上游引物0.5μl

下游引物0.5μl

*TaKaRa Ex Taq*HS 0.5μl上述的反转录反应液4μl

H2O 45μl

②各基因的上下游引物序列见表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 基因 | 上游引物 | 下游引物 |
| icaA | 5'-aacaagttgaaggcatctcc-3' | 5'-gatgcttgtttgattccct-3' |
| icaR | 5'-cgcaataaccttattttccg-3' | 5'-aaacaattctcaacactttttcgat-3' |
| luxS | 5'-tcctatgggttgtcaaactgg-3' | 5'-ccttctccgtagatgtcattcc-3' |
| sigB | 5'-tactctaagggacaatcacatc-3' | 5'-ggtactaagaaggcttcaaact-3' |
| 16S rRNA | 5'-ggcgactttctggtctgtaact-3' | 5'-ctagaggggtcagaggatgtca-3' |

③反应条件：

94℃变性30s，55℃退火30s，72℃延伸1min，进行30次循环。

1.2.8 PCR产物琼脂糖凝胶电泳及显影：

2%琼脂糖凝胶的配制：

①天平称取1.6g琼脂糖至锥形瓶中，倒入80mlTBE（1X）缓冲液，在微波炉加热溶解1min，轻轻晃动后置室温冷却

②冷却约60度，加入核酸染料（EB替代物）5ul，轻轻晃动混匀

③倒入插入梳子的配胶板中，不能有气泡。

④室温放置约30min至凝胶完全凝固，从配胶板中取出凝胶至电泳槽中，备用

电泳

30

①在电泳槽中加入电泳缓冲液（1XTBE）至淹没过凝胶

②样本准备：取步骤三扩增的PCR产物15ul加入10Xloding buffer 1.5ul，混匀

③点样用枪头吸取②轻轻注入电泳孔中，有一孔点样为（100bp）Maker 8ul。电泳条件：120V 40分钟

1.2.8 PCR产物的半定量分析：

采用Quantity one图像分析系统对各基因扩增条带进行定量分析，测定吸光度值，将各基因扩增条带的平均吸光度值与内参扩增条带的平均吸光度值之比作为各基因mRNA表达的半定量结果。

#### 1.2.9 统计学分析

实验数据用均数±标准差( *x*±s)表示，应用SPSSl9.0软件对相关数据进行两独立样本t检验，以*P*＜0.05认为有统计学意义。

## **2** 结果

### 2.1 葡萄糖标准曲线的建立葡萄糖标准曲线见图2-1。

葡萄糖曲线回归方程：Y＝0.638X+0.036，R2＝0.994



31

### 2.2 透过硫酸-苯酚对PIA进行定量，在大蒜素干预组PIA总量为48.691±

1.184，对照组为97.541±1.728，两组比较差异具有统计学意义（*P*＜0.05），细菌干重大蒜素干预组为2.103±0.062，对照组为2.816±0.073，两组比较差异具有统计学意义（*P*＜0.05），单位细菌干重的PIA含量通过换算确定，大蒜素干预组为307.241±14.563，对照组为393.215±17.835，两组比较差异具有统计学意义（P＜0.05），表2-1。大蒜素干预后，生物膜中PIA的总含量明显、细菌干重、单位细菌产生PIA量显著减少，即细菌产生胞外多糖粘附素的能力明显减弱（P<0.05）。

表 2-1 表皮葡萄球菌生物膜PIA含量( x±s，n=8)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 | PIA 总量/μg | 细菌干重/mg | PIA 总量（μg）/细菌干重（10mg） |
| 生理盐水对照组 | 97.541±1.728 | 2.816±0.073 | 393.215±17.835 |
| 大蒜素处理组 | 48.691±1.184 | 2.103±0.062 | 307.241±14.563 |
| P 值 | P ＜ 0.05 | P ＜ 0.05 | P ＜ 0.05 |

### 2.3 各基因的电泳条带见图2-2，使用凝聚成像系统测定各扩增产物的条带灰度值，计数各个目的基因与内参16S rRNA基因的灰度值比见表2-2，大蒜素干预后，目的基因icaA和sigB内参基因的灰度值之比降低，icaR和luxS各自与内参基因的灰度值之比增加。表2-2。



图2-2示，大蒜素干预后，目的基因icaA和sigB基因的灰度值降低，icaR和luxS基因的灰度值增加。1为大蒜素组，2为生理盐水组。

32

表 2-2 各基因在不同亚抑菌浓度大蒜素作用下mRNA表达（A/对照，x±s, n＝12）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | icaA | icaR | luxS | sigB |
| 生理盐水对照组 | 0.6310±0.0401 | 0.2826±0.0636 | 0.1611±0.0481 | 0.5281±0.0395 |
| 大蒜素组 | 0.4084±0.0461 | 0.4253±0.0513 | 0.3491±0.0295 | 0.37854±0.0417 |
| P | ＜0.05 | ＜0.05 | ＜0.05 | ＜0.05 |

## 3 讨论

耐药菌株的增加和专门针对细菌生物膜抗菌药物开发的挑战，是生物材料相关感染治疗中的重大问题。体外研究表明，生物膜内细菌耐抗生素浓度能力比相应的浮游菌增加500 - 1000倍[79-81]。表皮葡萄球菌为最常见的植入性生物材料相关感染的病原菌，主要是毒力因子是形成生物膜，提高了对抗生素的耐药能力。

表皮葡萄球菌经常出现在人类正常的皮肤表面和鼻粘膜中，但是，它可以作为条件致病菌造成感染，像其他一些凝固酶阴性的葡萄球 菌

（Coagulase-negative staphylococci CNS）一样具有强大的产生生物膜的能力，生物膜对细菌的保护作用针对不同的抗生素或宿主防御可能存在不同的机制。首先，生物膜的基质就是一个机械屏障，免疫细胞很难穿透[82]，这些胞外基质限制了抗生素的渗入进而使得细菌对抗生素产生耐药[83]。其次，生物膜内的细菌在一定程度上呈现生理上“休眠”——许多活跃的细胞显示减少活动，如细胞分裂、蛋白质合成或DNA复制[83]，这一特定的细菌状态增加细菌的耐药性，降低了抗生素抗菌作用发挥。处于“休眠”状态的细菌数量增加，也阻止的抗生素的效能发挥[84]。另外，表皮葡萄球菌生物膜细胞外基质能阻止摄入细菌的吞噬细胞[85]。生物膜使得人体的免疫系统和抗生素治疗都很难消灭它们，其表面结合的所有多聚物在细菌细胞与细胞之间的粘附以及细菌细胞与其他生物和非生物表面的粘附中都起着非常重要的作用。

细菌生物膜的形成大致可分为四个阶段：1.细菌的初始粘附，胞外DNA参与表皮葡萄球菌生物膜形成且与细菌的初始粘附密切相关。2.细菌的聚集，细菌粘附至高分子材料表面后，通过聚集因子集聚、增值形成微菌落。在这一过程中，涉及到多种聚集相关因子参与，在葡萄球菌生物膜的形成过程中PIA是最重要的

33

介导聚集的因子，它与肽聚糖共同形成粘质，粘质的合成是表皮葡萄球菌在内植物表面形成生物膜的必需过程[86]。3.细菌生物膜的成熟，葡萄球菌生物膜的成熟包括：细菌增值，细胞间通过一系列胞间物质的粘附，形成生物膜的三维结构。

PIA的合成影响生物膜的三维结构[87]。4.生物膜细菌的释放，生物膜中细菌的脱落是细菌感染得以传播的关键，可以是单个细菌脱落，也可以是大量细菌形成细菌簇的形式脱落。PIA是表皮葡萄球菌细胞外基质（粘液）的主要组成部分[88]，聚-N-乙酰葡萄糖胺（PNAG）和PIA是两种亲缘关系非常近的革兰阳性细菌生物膜基质网的重要组成部分。凝固酶阴性的表皮葡萄球菌合成PIA，凝固酶阳性的金黄色葡萄球菌合成PNAG. PIA与表皮葡萄球菌生物膜的形成密切相关[89]，PIA在生物膜内菌逃避人体免疫系统监控中扮演着重要重要[90]，PIA合成减少直接是影响生物膜形成、生物膜内细菌脱落的重要因素之一。

我们的实验硫酸-苯酚法测定表皮葡萄球菌中PIA含量，干预组加入亚抑菌浓度的大蒜素，对照组加入生理盐水，实验结果显示干预组中PIA的总含量低于对照组，其原因分析如下，首先，大蒜素干预后单个细菌产生PIA的能力下降，

PIA总量（μg）/细菌干重（10mg）的实验结果支持这一推断。其次，PIA的减少导致细菌粘附能力下降，粘附在UHMWPE表面的细菌数减少，从细菌干重测试结果便可发现大蒜素干预组明显低于对照组。我们实验结果与之前的研究结论一致[54]。硫酸-苯酚法是根据多糖在硫酸的作用下水解成为单糖，在经过迅速脱水生成糖醛衍生物，该衍生物在苯酚作用下生成一种橙黄色化合物，再以比色法测定其含量，将测定结果与预先制作的葡萄糖标准曲线比较即可测出样品中PIA的含量。由于大蒜素对表皮葡萄球菌生长有影响作用和抑制了细菌在材料上的粘附，故用单位重量的细菌所产PIA的量来衡量两组间差异。

前期我们的实验已经证实了亚抑菌浓度的大蒜素可以抑制表皮葡萄球菌生物膜胞外多糖PIA的产生，因此我们希望探究大蒜素对PIA合成的抑制是否是通过对PIA合成的相关基因产生影响来实现的。选择与PIA合成密切相关的主要基因icaA、icaR、和luxS，提取RNA采用反转录PCR检测，通过反转录PCR我们可以比较出在大蒜素干预下这几个基因表达水平的变化。

在PIA的合成过程中需要N-乙酰葡聚糖胺转移酶，它是由ica操纵子编码

34

合成的, ica操纵子定位于细菌染色体，全长3.4kb, ica操纵子由icaA、icaD、

icaB和icaC四部分组成，icaA编码合成PIA合成所必需的N-乙酰葡聚糖胺转移酶，如果icaA基因缺失，表皮葡萄球菌将不能产生成熟的生物膜。icaA单独表达的N-乙酰葡糖胺转移酶呈现低活性，icaA与icaD共同表达，酶活性将显著提高，合成最长不超过20个残基的N-乙酰葡糖胺低聚物，该低聚物在icaC的作用下，低聚物才能组成更长的链状结构。icaB似乎不直接参与PIA合成，它编码的细胞壁附着蛋白，将N-乙酰葡糖链脱去乙酰基，最终合成N-乙酰葡糖胺多聚物[91]。脱去乙酰基作用在表皮葡萄球菌的主要致病机制中扮演着重要作用[92]。icaADBC这四个基因属于同一个操纵子，它们在icaA启动子的作用下总是共同表达的，所以检测icaA的表达水平就可代表ica操纵子的表达水平[93]。

icaR位于icaADBC基因的上游，能表达出转录抑制蛋白，与icaA的5`端的起始密码子相结合能高效负调节ica操纵子的转录[94]。Conlon等[95]研究显示，

icaR蛋白并不参与自身的转录调节，但icaR基因插入突变使icaADBC操纵子转录增加5.8倍以上。全局性调控因子SigB是表皮葡萄球菌重要的调控因子，敲除sigB基因后，突变株的PIA合成和生物膜形成均降低。通过转录分析，sigB突变株中icaR的转录明显升高，icaADBC的转录则随之受到抑制，表明表皮葡萄球菌的sigB基因依赖icaR途径对生物膜进行调控[96]。密度信号感应系统

（quorum sensing systems, QS）是指细菌细胞密度依赖的细胞间信号机制，可以协调细菌特定基因的表达。其中luxS QS系统在表皮葡萄球菌生物膜的形成中起负调节作用，它与ica操纵子依赖性通路有关。luxS基因的突变能够抑制luxS的转录并进一步改变PIA的合成来调控生物膜的形成[97]。

本试验发现，在亚抑菌浓度的大蒜素干预下，编码PIA合成酶的基因icaA表达减少，依赖icaR途径对生物膜进行调控全局性调控因子SigB表达减少，抑制icaA表达的icaR和luxS的表达增多，上述表达结果都会使得PIA的合成受到抑制。据此我们认为，大蒜素通过正调控基因icaA和SigB的表达减少和负调控基因icaR和luxS的表达增多来减少表皮葡萄球菌生物膜中PIA的产生。上述几个基因之间存在着复杂的交互影响，大蒜素是通过作用于上游基因

SigB和luxS，来影响下游基因icaR和icaA，还是同时对SigB、luxS、icaR

35

和icaA这四个基因直接产生影响目前还需要进一步研究。另外表皮葡萄球菌生物膜形成受很多因素影响，其机制也未完全清楚，所以大蒜素影响表皮葡萄球菌生物膜形成的机制是需要进一步的研究和探索。

总之，亚抑菌浓度的大蒜素能够降低表皮葡萄球菌生物膜中PIA的含量，大蒜素可能是通过降低正调控基因icaA和SigB的表达和增加负调控基因icaR和luxS的表达来减少表皮葡萄球菌生物膜中PIA的产生。影响生物膜的形成因素众多且辅助，大蒜素影响生物膜的形成可能还存在其他作用机制，大蒜素是否还存在对于生物膜形成的其他形成因素有影响，需要继续对此开展研究。

36

素对生物膜内菌的杀灭作用

# 第三部分 大蒜素对超高分子聚乙烯和钛合金材料表面表皮葡萄球菌粘附影响及联合万古霉素对**Th**物膜内菌的杀灭作用

人工关节置换极大地缓解了终末期关节疾病病人的疼痛和改善肢体功能。随着人口老龄化趋势的逐渐扩大，需要人工关节置换病人的数量必然会逐年上升。伴随在人工关节置换的增多，人工关节感染的数量也必然增加，此类感染的一个重要特性是均与植入材料相关，植入人体的人工关节在体内为能产生生物膜的细菌提供引起感染的附着表面。生物膜形成后，使得常规抗生素治疗和人体免疫系统对细菌的杀灭作用大大降低，假体周围局部组织进一步破坏，轻则毁坏假体功能，重则威胁患者生命。

表皮葡萄球菌生物膜形成过程中，首先是细菌快速粘附在高分子材料表面，然后是聚集多层的细胞簇和多糖蛋白复合物[98]，高分子聚乙烯和金属钛是人工关节常用的材料，细菌粘附到人工关节材料的表面是发生人工关节感染的第一步。表皮葡萄球菌是人工关节感染的主要致病菌，其发病机制主要是表皮葡萄球菌在人工关节表面形成生物膜，导致临床治疗非常困难。细菌粘附定植在植入人体的材料表面又和材料种类密切相关，其中高分子聚乙烯最容易被生物膜型细菌粘附。

## **1.** 材料与方法

### 1.1 高分子聚乙烯材料准备 UHMWPE垫圈（外径8mm，内径3.5mm，厚度1.2mm广州奥特工程塑料有限公

司加工），使用去污剂浸泡6h，更换去污剂，40℃超声震荡洗涤10分钟。去离子水洗涤3次。高温高压(121℃, 15Kbp)消毒灭菌20分钟备用。

### 1.2 菌株、试剂和实验仪器

实验中表皮葡萄球菌标准菌株ATCC35984购自美国国家标准菌种保藏中心，其中，ATCC35984为生物膜阳性表皮葡萄球菌，所有菌株于-80℃含30％甘油的培养基中储存备用。

药物及主要试剂：大蒜素标准品（产品编号CDDM-A543500-1mg），购于广州

37

药物研究所，胰蛋白胨大豆肉汤(TSB，英国Oxoid公司)和胰蛋白胨琼脂培养基

（TBA，英国Oxoid公司），结晶紫(crystal violet)液：将结晶紫乙醇饱和液（结晶紫2g溶于20mL95%乙醇中）20mL和1%草酸铵水溶液80mL两液混匀置24h后过滤，室温保存备用；LIVE/DEAD®Bacterial Viability Kit（美国Thermo Fisher Scientific公司）

主要仪器：96孔培养板,3.5cm细胞培养皿，Costar公司；微量移液器（不同规格）, Eppendorf公司；超净台(ZHJH-C2109B/C2112B)，上海智城分析仪器制造有限公司；CO2控制细胞培养培养箱(Adolf Kuhner AG); FlexStation 3多功能酶标仪(美国Molecular Devices); Nikon A1激光共聚焦显微镜（日本尼康Nikon）；JSM-IT300型扫描电子显微镜（日本电子，日本）。

### 1.3 大蒜素对表皮葡萄球菌粘附高分子聚乙烯和金属钛材料的影响

实验分组，A组为生理盐水干预，大蒜素浓度为0 mg/L, B组为大蒜素浓度为1mg/L干预，C组为大蒜素浓度为2mg/L干预，D组为大蒜素浓度为4mg/L干预。

取出在-80℃冻存的表皮葡萄球菌（ATCC35984），接种于TSA平板。37℃有氧环境下培养24h。分别挑取细菌单克隆菌落，接种于2ml TSB中，37℃，130rpm，培养24h。用新鲜TSB将上述扩增细菌培养液稀释至1.0×104CFU／ml。将UHMWPE垫片放入24孔板中，加入稀释后的菌液和不同浓度的大蒜素，孔内溶液最终体积达到1mL，大蒜素的终浓度各组分别为O、1、2、4 mg/mL，37℃下静态培养3h。小心吸出培养液，用PBS缓冲液轻轻冲洗3次。将UHMWPE片取出后放入

lmlTSB中，超声振荡洗脱15min，剧烈振荡2min。将获得的细菌悬液梯度稀释后接种于TSA平板上，37℃培养24h。每种浓度复孔3个，每次实验重复3次。计数平板菌落，按照同一稀释度三次重复的平均菌落数×稀释倍数即为每个高分子聚乙烯表面粘附的细菌数。高分子聚乙烯垫圈体表面积＝（大圆面积－小圆面积）×2＋外侧面面积＋内侧面面积，根据垫圈参数（外径8mm，内径3.5mm，厚度1.2mm），按上述公式计算出的垫圈表面积为：76.73mm2，单位面积的细菌数＝细菌总数/表面积。对于金属钛表面的粘附选择钛合金螺钉，实验方法同上，由于钛合金螺钉表面积难以计算，最后以每个螺钉上的总的粘附细菌记录结果。

38

素对生物膜内菌的杀灭作用

平板法菌落计数：将待测样品作一系列稀释，再取一定量的稀释菌液接种到培养皿中，使其均匀分布于平皿中的培养基内，经培养后，由单个细胞生长繁殖形成菌落，统计菌落数目，即可换算出样品中的含菌数。操作步骤：①编号：取无菌平皿8套，在皿底分别标记10-5、10-6、10-7、10-8各2套。取1只装有99mL无菌水的三角瓶1只，标明10-2。另取6支盛有9mL无菌水的试管，排列于试管架上，依次标记10-3、10-4、10-5、10-6、10-7、10-8。②稀释：用1ml无菌吸管精确地吸取1mL原菌悬液放入10-2的三角瓶中，注意吸管尖端不要碰到液面，以免吹出时，容器内液体外溢。然后仍用此吸管将瓶内悬液来回吸吹三次，吸时伸入管底，吹时离开水面，使其混合均匀。另取一支吸管自10-2三角瓶中吸1mL放入10-3试管中，吸吹三次，„„其余依次类推。③取样：用

4支1mL无菌吸管分别精确地吸取10-5、10-6、10-7、10-8的稀释菌液1ml，对号放入编好号的无菌培养皿中。④倒平板：于上述盛有不同稀释度菌液的培养皿中，倒入溶化后冷却至45℃左右的胰蛋白胨琼脂培养基约10—15mL，置水平位置，迅速旋动混匀，待凝固后，倒置于37℃温室中培养。⑤计数：培养24小时后，取出培养皿，算出同一稀释度两个平皿上的菌落平均数，并按下列公式进行计算：每毫升中总活菌数=同一稀释度两次重复的菌落平均数×稀释倍数。

### 1.4 大蒜素对表皮葡萄球菌生物膜形成的影晌

生物膜定量实验，取冻存的表皮葡萄球菌菌株(ATCC35984)，接种于TSA平板。37℃有氧环境下培养24h。分别挑取细菌单克隆菌落，接种于2ml TSB中，在温度为37℃，220rpm震荡培养过夜，用新鲜TSB将上述扩增后的细菌培养液稀释至1.0×104CFU/mL。将UHMWPE垫片放入到标准24孔板中，加入上述菌液和大蒜素，孔内溶液终体积为lml，大蒜素的终浓度分别为O、1、2、4 mg/mL。在温度为37℃下静态培养24h后。小心移去培养液，PBS缓冲液缓慢冲洗3次。将高分子聚乙烯垫片放入到lmL的0.1％结晶紫溶液中，常温下染色20min。弃去染液后，用PBS缓慢淋洗3次。加入2ml的95％乙醇充分溶解。测量溶液在波长570nm下的吸光度。每种浓度复孔3个，每次实验重复3次。

### 1.6 激光共聚焦显微镜观察

为了解大蒜素联合抗生素是否能增加对生物膜内菌的杀灭作用，采用

39

Live/Dead染色法对生物膜内菌进行（STY09/PI双染法，原理是SYT09染上所有细胞为绿色荧光，死细菌被PI染为红色荧光，当两个荧光剂同时染上一个细胞时，PI可以淬灭SYT09的绿色荧光，因此，活细菌染成绿色，而死细菌染上红色）激光共聚焦扫描显微镜观察。实验分组为：（1）生理盐水对照组，(2) 4 mg/mL大蒜素组；(3) 20µg/mL万古霉素；（4）4 mg/mL大蒜素＋20µg/mL万古霉素组。在含量盖玻片的细胞培养碟内加入2mL用TSB稀释的浓度为1.0×104 CFU/mL的菌液，置于37℃培养24小时，加入按照上述分组中的要求，分别加入：生理盐水、大蒜素、万古霉素、和大蒜素联合万古霉素1mL，再置于37℃培养24小时，然后将菌液弃去，用无菌的PBS洗3次后试剂盒说明加入约1mL的Live/Dead进行染液，常温染色20分钟后置于激光共聚焦显微镜下观察。得到的数字图像首先进行形态学观察，然后利用Adobephotoshop7.0软件将图像中的红色和绿色分别提取，采用ImageProplus6.0软件对图像中红光和绿光所占面积及两者的比例进行分析。

### 1.7 统计分析

使用SPSS 17.0软件做统计分析。细菌粘附数和生物膜量等计量资料以均数

±标准差表示，生物膜内死菌和活菌量用率表示。各组计量资料使用单因素方差分析评估，率的比较用卡方检验。*P*＜0.05被认为是具有统计学意义。

## **2.** 结果

### 2.1 大蒜素对表皮葡萄球菌在高分子聚乙烯表面初始粘附影响的结果见图

（图3-1）。将不加大蒜素培养组作为空白对照。在不同浓度的大蒜素干预组之间，单位面积的高分子聚乙烯材料表面粘附的细菌数分别为：8.05×104CFU/mm2

（大蒜素浓度为0 mg/L，A组）、6.50×104CFU/mm（2 大蒜素浓度为1mg/L，B组）、

5.63×104CFU/mm2（大蒜素浓度为2mg/L，C组）、2.12×103CFU/mm2（大蒜素浓度为4mg/L，D组），没有大蒜素干预组粘附的细菌数最高，随着加入大蒜素浓度的增加，粘附细菌数量都明显降低。粘附细菌数量的下降跟大蒜素的浓度成负相关。当大蒜素浓度4mg/L时，高分子聚乙烯材料上的粘附细菌抑制最明显。上述结果表明大蒜素能够明显的抑制表皮葡萄球菌在高分子聚乙烯材料表面的粘附。各组

40

素对生物膜内菌的杀灭作用

间差异经统计学检验差异具有显著性(*P* ＜ 0.05)。

**1e+5**

**8e+4**

**细菌粘附 （ CFU/mm2 )**

**6e+4**

**4e+4**

**2e+4**

**0**

**0mg/L** 1mg/L 2mg/L 4mg/L

**图3-1** **高分子聚乙烯垫片表面粘附细菌数**

图3-1不同浓度的大蒜素干预，单位面积的高分子聚乙烯材料表面粘附的细菌数：生理盐水对照组（A组）为8.05×104CFU/mm2，大蒜素浓度为1mg/L干预组（B组）为6.50

×104CFU/mm2，大蒜素浓度为2mg/L干预组（C组）为5.63×104CFU/mm2，大蒜素浓度为4mg/L干预组（D组）为2.12×103CFU/mm2，各组间差异经统计学检验差异具有显著性，*P*＜0.05

大蒜素对表皮葡萄球菌在钛合金螺钉表面初始粘附影响的结果见图（图3-2）。不加大蒜素培养组作为空白对照。在不同浓度的大蒜素组间，单个钛合金螺钉表面细菌数分别为：8.45×104CFU（大蒜素浓度为0 mg/L，A组）、5.78×

104CFU（大蒜素浓度为1mg/L，B组）、1.86×104CFU（大蒜素浓度为2mg/L，C组）、7.07×103CFU（大蒜素浓度为4mg/L，D组），没有大蒜素组粘附的细菌数最高，随着加入大蒜素浓度的增加，粘附细菌数量都明显降低。粘附细菌数量的下降跟大蒜素的浓度成负相关。当大蒜素浓度4mg/L时，钛合金螺钉上的粘附细菌明显抑制。上述结果表明大蒜素能够明显的抑制表皮葡萄球菌在钛合金材料表面的粘附。各组间差异经统计学检验差异具有显著性(*P*＜0.05)。

41

1e+5

8e+4

6e+4

**细菌粘附数（ CFU ）**

4e+4

2e+4

0

0 mg/ L 1 mg/ L 2 mg/ L 4 mg/L

**图3-2** **螺钉表面细菌粘附数**

图3-2不同浓度的大蒜素干预，单个钛合金螺钉表面粘附的细菌数：生理盐水对照组（A组）为8.45×104CFU，大蒜素浓度为1mg/L干预组（B组）为5.78×104CFU，大蒜素浓度为2mg/L干预组（C组）为1.86×104CFU，大蒜素浓度为4mg/L干预组（D组）为7.07×103CFU，各组间差异经统计学检验差异具有显著性，P＜0.05

### 2.2 生物膜形成定量测定

实验主要通过结晶紫将生物膜染色后测定其在波长为570nm的吸光度，在不同浓度的大蒜素干预下，高分子聚乙烯表面生长的生物膜各组的吸光度分别为：4.38±0.55（大蒜素浓度为0 mg/L，A组）、4.17±0.67（大蒜素浓度为1 mg/L，

B组）、2.20±0.69（大蒜素浓度为2 mg/L，C组）、0.62±0.38（大蒜素浓度为4 mg/L，D组）。实验提示，随着大蒜素的增加，高分子聚乙烯材料表面的表皮葡萄球菌生物膜含量逐渐减少，当大蒜素浓度为4 mg/L时，生物膜含量最少

（图3-3）。1 mg/L大蒜素浓度干预组的生物膜量比生理盐水组少，但两组之间差异经统计学分析不具有统计学意义（*P*﹥0.05），而在大蒜素浓度2 mg/L组或为4mg/L时，各组间差异经统计学检验差异具有显著性(*P*＜0.05)。这说明大蒜素干预浓度在1mg/L是抑制UHMWPE表面生物膜形成的能力较低。

42

素对生物膜内菌的杀灭作用

6

5

4

**吸光度 （ 570 nm ）**

3

2

1

0

0 mg/L 1 mg/L 2 mg/L 4 mg/L

**图3-3** **不同大蒜素干预下高分子聚乙烯材料表面的生物膜含量**

图3-3 在不同浓度的大蒜素干预下，高分子聚乙烯表面生长的生物膜吸光度分别为：4.38

±0.55（大蒜素浓度为0 mg/L，A组）、4.17±0.67（大蒜素浓度为1 mg/L，B组）、

### 2.20 ±0.69（大蒜素浓度为2 mg/L，C组）、0.62±0.38（大蒜素浓度为4 mg/L，D组）。

A组与B组之间差异经统计学分析不具有统计学意义*P*﹥0.05，其余各组间差异均具有统计学意义，*P*﹤0.05

钛合金螺钉表面生长的生物膜各组的吸光度分别为：3.43±0.51（大蒜素浓度为0 mg/L, A组）、3.29±0.53（大蒜素浓度为1 mg/L，B组）、2.74±0.58

（大蒜素浓度为2 mg/L，C组）、0.59±0.25（大蒜素浓度为4 mg/L，D组）。实验提示，随着大蒜素的增加，钛合金螺钉表面的表皮葡萄球菌生物膜含量逐渐减少，当大蒜素浓度为4 mg/L时，生物膜含量最少（图3-4）。同UHMWPE材料实验类似，1 mg/L大蒜素浓度干预组的生物膜量比生理盐水组少，但两组之间差异经统计学分析不具有统计学意义（*P*﹥0.05），而在大蒜素浓度2 mg/L组或为4mg/L时，各组间差异经统计学检验差异具有显著性(*P*＜0.05)。这说明大蒜素干预浓度在1mg/L是抑制钛合金表面生物膜形成的能力较低。

43

5

4

3

**吸光度（ 570 nm ）**

2

1

0

0 mg/L 1 mg/L 2 mg/L 4 mg/L

**图3-4** **螺钉表面生物膜的含量**

图3-4 在不同浓度的大蒜素干预下，钛合金螺钉表面生长的生物膜吸光度分别为：3.43

±0.51（大蒜素浓度为0 mg/L，A组）、3.29±0.53（大蒜素浓度为1 mg/L，B组）、

### 2.74 ±0.58（大蒜素浓度为2 mg/L，C组）、0.59±0.25（大蒜素浓度为4 mg/L，D组）。A组与B组之间差异经统计学分析不具有统计学意义P﹥0.05，其余各组间差异均具有统计学意义，P﹤0.05

### 2.3 大蒜素联合万古霉素干预生物膜内细菌，通过共聚焦激光扫描显微镜检查结果

为进一步观察大蒜素联合万古霉素干预后生物膜内的细菌存活状况，经过STY09/PI双染色后激光共聚焦显微镜观察（绿色荧光代表生物膜内活菌，红色荧光代表生物膜内死菌）发现，在生理盐水干预组，可见大量的被染成绿色的生物膜内活菌存在（图3-5 a），在单独大蒜素干预组，仍然有大量的活菌存在，但数量较生理盐水干预组少，这可能是由于大蒜素干预后生物膜减少，存在于生物膜内的细菌也相应的减少（图3-5 b），在万古霉素干预组，存在大量的细菌，但在这些细菌中活菌和死菌同时存在，这主要是万古霉素能够杀灭生物膜浅层细菌，而在生物膜的深层仍然有活菌存在（图3-5 c）。而在大蒜素联合万古霉素干预组，细菌总数显著减少，图片中仅见少量死菌，这反应了大蒜素阻止了生物膜的产生后有利于万古霉素发挥杀菌作用，（图3-5 d）。可见大蒜素联合万古霉素能有效杀灭生物膜内的细菌，具有协同作用。（图3-5）

44

素对生物膜内菌的杀灭作用



图3-5a为在生理盐水干预下，可见大量的被染成绿色的生物膜内活菌存在；图3-5b为单独大蒜素干预组，较多活菌存在；图3-5c为万古霉素干预组，较多的活菌和死菌同时存在；图3-5d为大蒜素联合万古霉素干预组，细菌总数显著减少，仅见少量死菌

通过软件对各组图片的红色荧光（死菌）和绿色荧光（活菌）进行定量并汇总分析，生理盐水组细菌总量最大，大蒜素联合万古霉素组细菌总量最少。在生理盐水组，死菌占14.81%，活菌占85.19%；大蒜素干预组，死菌占21.74%，活菌占78.26%；万古霉素干预组，死菌占41.67%，活菌占58.33%；大蒜素联合万古霉素干预组，死菌占83.33%，活菌占16.67%；各组间差异经统计学检验具有统计学意义(*P*＜0.05)。各组生物膜的细菌总量、死菌及活菌量见图（图3-6）

**死菌**

**活菌**

3000

2500

2000

1500

**荧光数**

1000

500

0

**图3-6** **大蒜素联合万古霉素作用后生物膜内细菌生存情况**

图3-6在生理盐水组，死菌占14.81%，活菌占85.19%；大蒜素干预组，死菌占21.74%，活菌占78.26%；万古霉素干预组，死菌占41.67%，活菌占58.33%；大蒜素联合万古霉素干预组，死菌占83.33%，活菌占16.67%；各组间差异经统计学检验具有统计学意义，*P*＜0.05

45

## **3.** 讨论

在医疗内植材料广泛使用的今天，与内植物相关的感染也日趋增多。表皮葡萄球菌作为人体皮肤和粘膜的常居菌群，己成为内植入物相关感染的主要致病菌。在关节外科，表皮葡萄球菌引起的人工关节假体周围感染大约占总数的1/3以上。且这种感染治疗难度大、经济负担重、治疗时间长且容易复发，无论对于患者还是对于骨科医生都是极大的挑战[3]。这类感染主要是细菌粘附到植入材料表面并在粘附处形成生物膜[99]，生物膜的形成对医疗植入装置带来了三大问题。首先，在这些装置表面上的细菌群落可播散到体内其他部位，其实际上成为了细菌的贮存器，从而导致慢性感染，在人体抵抗力下降时，生物膜内菌可以释放出来，形成浮游菌，引起感染的复发。第二，生物膜细菌具有较高的抵抗抗生素治疗能力，因此，一旦这些生物膜细菌群落形成，用常规的抗微生物疗法消灭它们是极其困难的。第三，因为宿主自身免疫反应和通常规的抗微生物疗法难以彻底消除生物膜细菌，在生物膜的部位产生慢性炎症反应，迁延不愈。对于此类感染，对抗生物膜的形成解决这一难题的关键，而要抑制生物膜的形成，阻止细菌在内植入材料表面的粘附是非常必要的[100]。

本实验对不同浓度的大蒜素干预后表皮葡萄球菌(ATCC 35984)在UHMWPE和钛合金材料表面的粘附和生物膜形成进行研究。发现亚抑菌浓度的大蒜素降低了表皮葡萄球菌在UHMWPE和钛合金材料的粘附和阻止成熟的生物膜形成。UHMWPE和钛合金是目前人工关节主要使用的材料[101]，UHMWPE材料常用作人工关节金属材料之间的衬垫部分，而钛合金因有与骨组织相近弹性模量并具有较好的生物相容性常用作人工关节的金属部分[101]。考虑到在人工关节假体中，UHMWPE材料作为衬垫使用，其表面较为平坦，我们实验中将其制作成表面光滑的垫片形状，而钛合金在假体中形状不规则，我们直接使用骨科常用的钛合金螺钉进行实验。实验中我们设置不同浓度的大蒜素干预，当大蒜素浓度达到亚抑菌浓度时，表皮葡萄球菌在UHMWPE和钛合金表面的粘附被抑制。按照同样的实验干预措施，检测在UHMWPE垫片和钛合金螺钉表面的生物膜含量，发现亚抑菌浓度的大蒜素干预后生物膜含量显著减少，这一结果，通过扫描电镜图片也得到了证实。上述实验结果说明，亚抑菌浓度的大蒜素可以阻止了表皮葡萄球菌在假体材料UHMWPE 和

46

素对生物膜内菌的杀灭作用

钛合金表面的粘附，并由此导致生物膜形成的抑制。

细菌粘附在生物材料表面是此类外源性感染的重要步骤[102]，粘附的过程可分为两个阶段，即早期粘附和后期粘附，早期粘附是非特异性的和可逆的，范德华力和疏水作用是早期粘附的主要作用力；后期粘附是在各种相关的粘附因子作用下，细菌与生物材料表面之间发生的特异性不可逆结合。细菌粘附在生物材料表面后会有更多的细菌聚集于此，经过细菌之间相互粘附、分化、增殖形成具有多层结构的细胞团块，在PIA等因子介导下粘附的细菌可以分泌大量的粘液[103]。粘液主要成分是胞外多糖，系生物膜的主要组成部分，这使得它可以躲避宿主的免疫防御系统攻击和增加对抗生素的耐药性。粘附在假体表面的细菌可以潜伏很长一段时间，当宿主免疫力下降、假体周围缺少软组织时，这些粘附在假体上的生物膜内的细菌可以释放出来，形成浮游菌，便会引发感染复发[104]。

细菌粘附是一个极其复杂的过程，受多种因素影响，包括环境因素，如血清蛋白或抗生素，细菌和材料的表面特性等。细菌的独特的行为、材料的表面特性和细菌所处的环境变化共同控制粘附过程[105-108]。有研究认为细菌的流动特性强烈地影响细菌附着数量以及生物膜的结构和特性[109, 110]，流动性高粘附的细菌数量就好减少，因为较高的切变速率导致较高的分离势能，从而减少附着的细菌数

[111]. 电解质的浓度、培养环境的PH值也会影响细菌的粘附，研究表明，相比突然加入HCl，逐渐增加酸性的细胞存活的机会更大[112]，这说明菌群自身具有适应微环境PH变化的机制。对于大多数细菌而言，PH值为7时最有利于细菌产生胞外多糖，但对于不同的材料，最适应细菌粘附PH值也不一样[101]。抗生素减少细菌粘附与细菌对抗生素的敏感性和抗生素浓度有关[113]，如导尿管上的利福平

涂层可以降低表皮葡萄球菌的粘附[114]。材料本身的特性也会影响细菌粘附，不同功能的材料影响细菌粘附取决于材料的疏水性和电荷[104]，粗糙的表面促进种细菌粘附和生物膜的形成[115]。对于同一种材料，不同的细菌具有不同的粘附能力，因为它们具有不同的物理化学特性。细菌的亲水性或疏水性是一个重要的粘附因素，一般来说，疏水性细菌偏爱的疏水材料的表面；亲水性细菌更喜欢亲水表面，但疏水性细菌比亲水性细菌具有更强的粘附能力[104]。

临床治疗人工关节假体周围感染的药物多系抗生素药物，但由于假体材料表

47

面细菌粘附后产生生物膜，致使抗生素类药物治疗效果不够理想。我们之前研究表明亚抑菌浓度的大蒜素能够有效的抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成。基于这一结果，我们进一步研究了不同浓度的大蒜素对于表皮葡萄球菌在高分子聚乙烯和钛合金表面的粘附，发现亚抑菌浓度的大蒜素可以有效地阻止了表皮葡萄球菌在上述两种材料表面的粘附。结合我们前面的实验，大蒜素可以有效抑制PIA相关基因的表达，我们推断大蒜素可能通过抑制了PIA的形成，从而阻止表皮葡萄球菌在内植入材料表面的粘附，细菌粘附是生物膜形成的重要步骤，抑制了细菌粘附将减少生物膜的产生。但是细菌在植入材料表面粘附的过程非常复杂，且受到多种因素的影响，对于大蒜素抑制表皮葡萄球菌粘附的机制，需要进一步的研究和探讨。

实验中我们设计了大蒜素联合万古霉素干预UHMWPE表面的生物膜内菌实验，发现同单独的大蒜素干预、单独万古霉素干预和生理盐水对照组比较，大蒜素联合万古霉素干预后生物膜内的杀菌最多，活菌最少，总菌量最少。我们分析可能存在的机制如下，首先，大蒜素减少了PIA的形成，抑制细菌的粘附和聚集，阻止了生物膜的产生，使得生物膜内细菌总数减少，另外万古霉素杀死了部分生物膜浅层的细菌，这也能降低生物膜内菌的总量。其次，由于生物膜量减少，细菌周围生物膜的密度降低，这有利于万古霉素渗透至生物膜的深层，从而有效杀灭生物膜内细菌。大蒜素与万古霉素的联合应用是抗生物膜药物与抗生素的联合，虽然生物膜内菌对于抗生素的耐药性增强，但若在抗生物膜药物同时存在的情况下，细菌周围的生物膜减少，生物膜对于抗生素的屏蔽作用降低；由于PIA的减少，生物膜内菌之间的相互聚集作用被阻止，生物膜内菌联系减少，相对孤立，呈现了浮游菌的特性，这有利于抗生素发挥杀菌作用。另外，生物膜内的细菌可以从“休眠”状态复活，也增加了对抗生素的敏感性，

总之，亚抑菌浓度的大蒜素有效地阻止了表皮葡萄球菌在UHMWPE和钛合金表面的粘附，降低了生物膜的形成；亚抑菌浓度的大蒜素联合万古霉素可以有效杀灭生物膜内的细菌。

48

# 第四部分 人工关节假体感染兔模型的建立与评估

伴随着人工关节置换的数量不断增加，人工关节假体发生感染的数量也相应地增加，由于生物膜细菌感染的存在，给治疗带来了巨大的挑战。引发的生物膜感染也在逐年上升，在对各种创新的治疗方法的评估中，动物模型有着不可替代的作用。本研究的目的是利用与人工关节同样的植入材料设计和评估一种新的人工关节生物膜型感染的兔动物模型，利用这个模型评价抗感染的治疗。

## **1.** 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 内置物材料：

超高分子量聚乙烯(UHMWPE)垫圈，外径8 mm，内径3.5 mm，厚度1.1 mm，广州奥特工程塑料有限公司加工。（图4-1）

钛合金松质骨螺丝钉，直径3.5 mm，长度15 mm，江苏国立医疗器械有限公司生产。（图4-1）

#### 1.1.2 实验动物

新西兰白兔40只，体重2.5-3.5kg，雌雄部分，清洁级，广东省实验动物中心购入。

#### 1.1.3 实验菌株

表皮葡萄球菌RP62A ( ATCC35984)，购自美国国家标准菌种保藏中心。

#### 1.1.4 实验试剂及仪器

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)，英国Oxoid公司

戊巴比妥钠（Pelltobarbitalum Natricum），北京普博斯生物生产

CO2控制细胞培养培养箱，瑞士Adolf Kuhner AG胰蛋白胨大豆琼脂（TSA），英国Oxoid公司

DJ-220A高精密电子天平，东莞东恒称重设备有限公司生产Q104-单槽超声波清洗机，东莞市万志自动化设备有限公司生产冷冻干燥机(FD-1)，北京德天佑科技发展有限公司生产

49

CrystalSpecTM浊度计，美国Becton Dickinson公司婴儿称RTA-10A-TRG型，无锡市衡器厂生产

JSM-IT300型扫描电子显微镜，日本，日本电子公司生产手术器械及消毒、缝合材料，购于广州医疗器械公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组：新西兰大白兔共40只,体重约2.5-3.5 kg,适应性喂养1周，使用随机数字表随机分为A、B、C、D四组，分别接种生理盐水、1×103、1

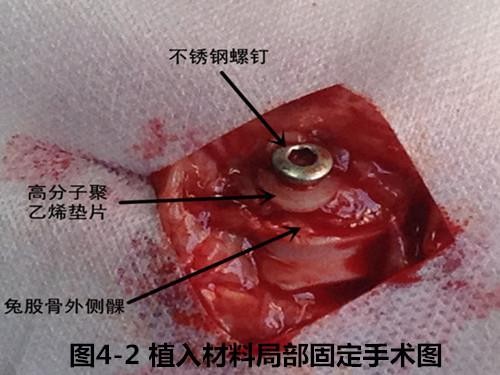
×104、1×105 CFU表皮葡萄球菌1mL，每组10只。

#### 1.2.2 接种菌液配置：将冻存于-20℃条件下的表皮葡萄球菌常温下解冻后，用接种环将细菌接种至培养皿上，置于37℃孵箱，孵育18-24h后，挑取单个菌落接种到10ml无菌TSB培养基中，在37℃17Orpm条件下摇晃培养24h，获得纯种菌液。配置浓度分别为1×103 CFU/ml、1×104 CFU/ml、1×105CFU/ml菌液备用。

#### 1.2.3 手术操作

手术是在戊巴比妥钠（30毫克/公斤，静脉注射）全身麻醉下进行的，右下肢剃去毛发，仰卧于动物手术台并将四肢固定，拉出兔舌用单层生理盐水纱布包裹固定，安尔碘消毒手术区域，在兔右侧后肢膝关节外侧作2厘米纵向皮肤切口，切开筋膜和关节囊，暴露骨科外侧髁和外侧副韧带，在外侧副韧带附着点前沿着冠状轴方向从股骨外侧髁向内侧方向钻孔（钻头直径3.5mm），以一枚无菌钛合金螺钉和高分子聚乙烯垫片固定在股骨外侧髁部（图4-2）。4-0尼龙缝合线缝合关节囊，用2mL的注射器将1mL不同浓度表皮葡萄球菌菌液（按照各组设定的菌液浓度接种，对照组接种生理盐水）接种于关节腔内，4-0尼龙缝合线缝合深筋膜和皮肤。每个兔子接受扑热息痛（30毫克/公斤/天）治疗3天，作为手术后镇痛治疗。每日监测体温和体重。

50



#### 1.2.4 无菌取材及组织细菌计数

术后14天于兔耳缘静脉取血1mL行血培养，戊巴比妥钠100mg/kg i. v至兔安乐死，取仰卧位将兔固定动物手术台上，安尔碘消毒右后肢膝关节周围2次、铺无菌手术巾，在膝关节外侧切除原切口疤痕，进一步切开肌肉、关节囊、切断髌韧带，将髌骨向近侧翻转，暴露右膝关节关节腔。观察兔膝关节内有无脓液形成。切取膝关节关节囊及滑膜组织置入增菌液内培养。取出高分子聚乙烯垫片，

PBS液冲洗表面，2.5%戊二醛 PBS液固定后待行生物被膜观察。钛合金螺钉取出后置于2mL的生理盐水中利用超声洗脱仪洗脱5分钟后送细菌计数。

关节囊和滑膜称重、匀浆后经过连续稀释液接种至TSA板，在37℃培养24小时后进行菌落计数，通过计算确定样品每克组织含有的菌落数，螺钉洗脱液经过连续稀释接种至TSA板，在37℃培养24小时后进行菌落计数，计算出每个螺钉含有的菌落数为结果。

#### 1.2.5 感染判定

螺钉经过培养发现表皮葡萄球菌，同时在膝关节关节囊及滑膜组织培养发现有表皮葡萄球菌，判定兔膝关节假体及周围组织存在感染。

#### 1.2.6 电镜扫描

UHMWPE垫圈经过PBS缓冲液缓慢冲洗3次，处理完成后，立即将高分子聚乙烯垫片放到2%的戊二醛里浸泡2小时，30％、50％、70％、90％、100％乙醇梯度脱水，离子溅射仪喷金后，逐个进行SEM观察，随机选取视野并拍照。

1.2.7

使用spss17.0软件进行统计分析，计量资料使用单因素方差分析，率的比较使用卡方检验。设*P*﹤0.05差异具有统计学意义。

51

## **2** 结果

### 2.1 大体标本观察及相关指标监测

各组动物实验前体重：A组2.89±0.56kg，B组3.23±0.49kg，C组,3.01

±0.72kg，D组2.84±0.76kg。各组间差异无统计学意义，*P*﹥0.05；实验动物取材时体重：A组2.69±0.45kg，B组2.93±0.58kg，C组，2.31±0.88kg，D组2.74±0.63kg，各组间差异无统计学意义，*P*﹥0.05；各组动物在实验过程中体温分别为：A组38.4±1.7℃，B组38.9±1.2℃，C组39.0±1.5℃，D组38.8

±1.3℃，各组间差异无统计学意义（*P*﹥0.05），所有的动物在取出标本时均成活，所有试验兔血培养均是阴性，除去伤口的变化外没有出现其他并发症。在取出标本时，手术切口红肿、裂开判定为愈合不良，A组（生理盐水对照组）有0例，B组（接种1×103CFU表皮葡萄球菌）1例红肿，C组（接种1×104CFU表皮葡萄球菌）1例红肿，D组（接种1×105CFU表皮葡萄球菌）1例红肿和2例裂开，愈合不良的伤口膝关节滑膜组织细菌培养均阳性。D组出现2例伤口裂开，裂开的伤口可见分泌物，膝关节结构及内植物无外露。A组膝关节液均清洁、透明、无混浊，量无明显增加，无脓液形成；B组兔膝关节滑膜和植入材料表面可见黏液样物质形成5例。C、D兔膝关节滑膜和植入材料表面可见黏液样物质形成。

### 2.2 兔膝关节周围软组织、螺钉感染与细菌计数

在各组中，A组所有动物的膝关节软组织和植入的假体均没有发生感染，C组和D组动物假体和膝关节周围软组织都发生感染，感染率为100%, B组中软组织和假体感染分别是2例和3例，感染率分别是25%和37.5%。各组软组织细菌计数差异具有统计学意义，*P*﹤0.05；各组螺钉细菌计数差异具有统计学意义，*P*

﹤0.05；各组动物感染率比较除去C组和D组之外，其它个之间差异具有统计学意义，*P*﹤0.05；各滑膜组织、螺钉感染及细菌培养计数见表4-1。结合伤口愈合情况确定C组接种1×104 CFU表皮葡萄球菌为适宜的感染剂量。

52

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 表 4-1 关节周围软组织、螺钉感染与细菌计数 | | |
| 组别 | 软组织  感染/总数（CFU/g） | 螺钉  感染/总数（CFU） |
| A | 0/8(1.01×101) | 0/8(1.01×101) |
| B | 2/8(3.41×104) | 3/8(3.41×104) |
| C | 8/8(5.23×107) | 8/8(5.09×107) |
| D | 8/8(4.84×107) | 8/8(6.37×107) |

### 2.4 各组UHMWPE垫片表面扫描电子显微镜观察

我们随机选取UHMWPE垫圈的观察区域，在扫描电子显微镜观察生理盐水对照组UHMWPE表面时，几乎没有发现细菌和生物膜存在，仅见UHMWPE表面在扫描电镜下呈现的表现（图4-3a）；在接种103 CFU表皮葡萄球菌组UHMWPE垫片表面均有少量细菌和生物被膜形成，并可见部分没有细菌和生物膜覆盖的UHMWPE材料表面（图4-3b）；在接种104和105 CFU表皮葡萄球菌组UHMWPE垫片表面均有大量细菌和生物被膜形成（图4-3c, 图4-3d），生物被膜内表皮葡萄球菌聚集，圆形的表皮葡萄球菌被基质包裹，生物被膜形态、大小不一，UHMWPE表面均被生物膜或细菌覆盖。



图4-3a为接种生理盐水作为对照组，没有发现细菌和生物膜存在；图4-3b示接种浓度为103 CFU表皮葡萄球菌，在UHMWPE垫片表面有少量细菌和生物被膜形成；图4-3c，图4-3d分别在接种104和105 CFU浓度的表皮葡萄球菌，UHMWPE垫片表面均有大量细菌和生物被膜形成

53

## **3** 讨论

全膝关节置换术后感染的是一种破坏性并发症，且治疗困难、预后不良。其治疗方法从关节灌洗到清创置换假体甚至截肢，这些治疗方法要么复发率高，要么治疗过程漫长、花费较大[116]。所以人工关节置换后发生感染的治疗尚有很多问题需要解决，这对于骨科医生都是巨大的挑战。人工关节置换后假体感染属于内植入材料感染，此类感染发病机制的核心是生物膜形成，所以动物模型的建立首先需要选择能够产生生物膜的菌株；其次，生物膜形成与植入材料密切相关，在建立动物模型时应该选择目前临床常用的材料。另外，实验动物的选择应该根据研究的内容确定，对于涉及到外科治疗操作的实验研究，小型动物难以满足需要，但大型动物花费的费用太高，管理也更加困难，鉴于此，我们选择新西兰白兔作为实验动物。

我们的实验结果提示在C组和D组实验动物的软组织均发现细菌存在，在假体表面均有生物膜出现，也就是说这两组动物关节假体和周围组织都已感染了，感染率为100%，结合伤口愈合情况，但D组出现了手术切口的裂开和红肿，所以我们认为C组接种菌量适合作为模型接种菌量。

在人工关节置换术的动物模型中，包括人工关节常见组件材料的文献并未发现[117]，而对于生物膜型感染，不同细菌对于不同材料的粘附及参数生物膜的能力亦有差异。也就是说，对于人工关节感染的动物模型采用的植入材料和感染细菌应该最大限度地接近临床实际使用的人工关节材料和最常见的感染菌株。我们的实验中植入的UHMWPE和钛合金是目前人工关节常用的材料，感染菌株为能稳定产生生物膜的表皮葡萄球菌（RP62A ATCC35984），这有利于模拟临床人工关节生物膜感染，获得较为均一的动物模型。实验中，我们发现接种1mL浓度为104CFU的表皮葡萄球菌于兔膝关节后，在膝关节植入的UHMWPE和钛合金表面产生了生物膜及细菌粘附，关节周围软组织发生了感染，且动物伤口愈合良好，没有出现其他并发症，动物的感染率为100%。可见，这种接种计量时较为理想的接种计

量。在骨关节系统常见的生物膜感染动物模型时假体装置引发的骨髓炎动物模型，

此类模型常选择金黄色葡萄球菌[118, 119]，人工关节的动物模型应该具有应该保留关节的运动功能，这给模型的制作提出很高的要求，如果制作适合动物运动的动

54

物假体关节，则需要花费大量的精力和财力，所以我们将假体植入到兔股骨外侧髁部位，在不破坏动物关节的前提下，成功地将与人工关节同样的材料的假体植入到关节腔内，基本满足模拟临床PJI的假体环境。

假体感染治疗及其困难，其主要原因是生物膜菌在假体表面形成生物膜，假体材料为生物膜型细菌的生存和繁衍提供了良好的体内环境，细菌粘附在假体表面产生生物膜，故人工关节感染是典型的生物膜感染，生物膜内包含一种或多种细菌，由小的菌落、菌群、细胞外多聚物（如胞外多糖）基质及沉积在生物膜内的相关物质构成，生物膜内的细菌是有组织的、相互联系的共生体，在结构和功

能上类似于多细胞有机体[120, 121]，生物膜内的微生物可以被释放出来转化为浮游菌，并传播到其他部位再次形成生物膜[122]。生物膜作为细菌的一种生存形式，比浮游菌具有更强的耐药性。又因为假体没有血液供应，药物很难达到贴近假体表面的细菌，给治疗又增加了更大的困难。

为了模仿围手术中伤口污染引起的PJI，细菌被直接注射到植入材料表面，这种方法之前被成功地用在假体感染的其它动物模型中[123]。也有一些将植入材料先同细菌一起培养，让细菌在材料表面先形成生物膜，然后将沾有细菌的植入材料植入到动物体内[124, 125]，诱发感染。但这一细菌接种方案可能无法达到统一的细菌接种量，从而在动物模型中个体感染程度差异会增大。

本实验制作的兔人工关节生物膜感染模型具有如下特点：①兔膝关节的关节面及韧带结构未损伤，对兔术后关节功能无影响，②植入材料反映了人工关节的材料特点，反映临床人工关节与感染细菌在体内的相互作用，③内植物与关节

腔相通，可部分反应人工关节所处的环境。④实验中采用的菌株是标准株，具有较好的产生生物膜的稳定稳定性，有利于在动物模型之间产生较好均一性。但这类模型不能反映假体之间的磨损，对于研究假体磨损的实验该模型不适宜。总之，该模型基本上临床上人工关节材料和细菌的相互关系和周围环境，是研究生物膜细菌引起的人工关节感染药物治疗的适宜动物模型。⑤本模型植入的假体在形态结构和功能上并不具备人工关节的特点，对于研究关节磨损类的实验研究，此模型并不适合。

55

# 第五部分 大蒜素联合万古霉素灌洗兔人工关节假体感染的实验研究

大约1-2％的接受人工关节置换术的病人在手术后第2年发生人工关节感染

[126]，人工关节假体感染是一种少见的但非常严重的并发症[127-129]，由于行人工

关节置换手术的病人越来也多，发生PJI的人数将会逐渐增加[129]。PJI导致人工关节的功能下降，治疗中需要长期使用抗生素、甚至多次手术，这给患者个人和医疗保健系统都带来了巨大的经济负担[116, 129, 130]，而且，PJI的治疗对于骨科医生来说也是巨大的挑战，有研究表明目前的治疗细菌清除率较低[131-133]。对于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的清除率在18%-37%之间[131, 132]，对于链球菌和其它的病原菌大约在65%-75%之间[133]。一些分析研究将葡萄球菌感染作为灌洗清创保留假体治疗失败的风险因素[134]，而对于由革兰氏阴性细菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和对甲氧西林敏感的阳性菌引起的PJI，即使是采用二期置换方案，其治愈率也只有52%、51%和69%[135]。在PJI使用抗生素治疗中，要想达到满意的疗效，必须要在生物膜中达到有效的抗生素活性[116]。对于何时使用抗生素和整个使用抗生素时间目前尚没有统一的标准[136]。另外，对于PJI的治疗，北美和欧洲的治疗存在明显的不同[136]，对于目前存在的治疗治疗方案依然存在很多争论[116, 137]。假体相关的感染细菌以表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌为主[138, 139]。表皮葡萄球菌对中的高分子聚乙烯材料具有较强的吸引力，而金黄色葡萄球菌则更易粘附假体的金属材料部分[139]，可见，在PJI的治疗中出现不同的结果是受很多因素影响。

细菌粘附在关节假体表面产生生物膜，使得PJI的治疗变得非常困难[138]，其原因是生物膜能够抵御宿主的细胞免疫和体液免疫反应，同时生物膜内的细菌对抗生素具有较低的敏感性[140, 141]。生物膜的形成和发展是一个动态的过程，包括细菌的粘附、聚集、成熟和播散[142]，生物膜内的细菌可以长时间存在于体内，并可传播到其他植入物表面形成新的生物膜。常规的抗感染治疗可以杀死浮游细菌，但不能彻底杀灭生物膜内细菌，而这些生物膜内菌在某些情况下又可以作为

56

细菌源引起感染的复发。这解释了临床上慢性人工关节感染治疗时间长、易复发的特性[143]。所以，抑制细菌粘附到假体植入材料表面阻止生物膜生长是治疗生物膜相关的假体感染的有效途径[144]。

大蒜治疗感染具有悠久的历史，它的有效成分是蒜素。体外实验证实大蒜素具有抗表皮葡萄球菌生物膜形成的活性，亚抑菌浓度大蒜素可以阻止表皮葡萄球菌粘附和聚集，进而抑制了生物膜的形成[145, 146]。万古霉素可以用来治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌感染[147, 148]，然而单独使用万古霉素并不能清除粘附于假体表面能产生生物膜的表皮葡萄球菌[147]，如果联合利福平却可以用来治疗表皮葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌一起的PJI[9, 147]。由于大蒜素能抑制细菌的粘附和聚集，阻止生物膜的形成，因此我们假设如果大蒜素联合万古霉素治疗有生物膜形成的PJI，可以获得较好的疗效。本研究利用新西兰白兔制作人工关节假体感染的动物模型，将万古霉素和大蒜素联合灌洗感染的关节。

## **1.** 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

表皮葡萄球菌（RP62AATCC35984），购自美国国家标准菌种保藏中心胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)，购自青岛海博生物科技有限公司

万古霉素注射液，日本EliLilly公司生产

大蒜素注射液，中国江苏徐州莱恩药业有限公司生产

### 1.2 实验试剂及仪器

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)，英国Oxoid公司

戊巴比妥钠（Pelltobarbitalum Natricum），北京普博斯生物公司生产CO2 控制细胞培养培养箱，瑞士Adolf Kuhner公司

胰蛋白胨大豆琼脂（TSA），英国Oxoid公司

DJ-220A高精密电子天平，东莞东恒称重设备有限公司生产Q104-单槽超声波清洗机，东莞市万志自动化设备有限公司冷冻干燥机(FD-1)，北京德天佑科技发展有限公司

CrystalSpecTM浊度计，美国Becton Dickinson

57

婴儿称RTA-10A-TRG型，无锡市衡器厂生产

JSM-IT300型扫描电子显微镜，日本，日本电子公司生产

### 1.3 兔膝关节假体感染动物模型制备

32只新西兰白兔购自广东实验动物中心，体重为2.5-3.5kg，雌雄不分，单笼喂养，常规喂食、水，常规昼夜交替。在适应性喂养1周后，按照前述的PJI兔模型的制作方法建模。详见第四章的实验。

1.4实验分组和关节灌洗

细菌接种后14天，兔PJI模型利用随机数值表被随机分配到四组，在麻醉下安装关节内灌洗装置，每组8只，各组关节内持续灌洗按照以下方案实施，A组：生理盐水；B组：万古霉素20µg/mL；C组：蒜素4 mg/L；D组：万古霉素20µg/mL

＋蒜素4mg/L。

关节内灌洗装置安装如下。在全身麻醉下（同模型制作的麻醉方法），在膝关节中线做一个2.5厘米的皮肤切口，用12号套管穿刺针横向自髌骨上方刺入

关节腔，拔出针芯，将一静脉输液管由穿刺针插入膝关节腔1.5 - 2厘米，用

4-0尼龙缝合线固定输液管与软组织上。此管作为灌洗液流入管道。同样的方法在髌骨下部植入灌洗液流出管（图5-1）。最后缝合皮肤并消毒皮肤。伤口覆盖无菌辅料，石膏固定膝关节（图5-2）。500毫升液体灌洗袋放置在膝关节上方 1

米处，通过调剂器控制灌洗液以1-1.5毫升/分钟灌洗速度。连续灌洗3天（图5-3）。灌洗治疗期间，将原兔笼用金属网分隔成窄笼，可以防止兔在笼中移动引起灌洗管扭曲。



图5-1 膝关节灌洗装置安装术中图，灌洗进水管自髌骨外上方进入关节腔，灌洗出水管自髌骨内下方进入关节腔

58



图5-2 膝关节假体感染灌洗石膏固定，固定石膏包括兔下肢的大腿和小腿部分



图5-3 兔膝关节假体感染灌洗模式图，灌洗装置固定于兔胸壁上

### 1.4 标本取材、观测生物膜形成和细菌均数

完成灌洗后12小时，静脉注射苯巴比妥（100毫克/公斤）安乐死实验动物并取材，无菌条件下切开兔右侧后肢膝关节并取出植入的螺钉和垫圈，5毫升磷酸盐缓冲液淋洗螺钉冲洗去除表面浮游细菌，然后放置于玻璃烧杯并加入5毫升无菌生理盐水。将烧杯连同螺钉放入超声洗脱仪进行洗脱5分钟，完毕后取1mL洗脱液样本以TSB连续稀释和接种TSA琼脂板上。在37℃下经过24 h孵化后，进行细菌数数（具体操作方法见前述）,结果表示为log10集落形成单位(CFU) /毫升。实验重复三次进行细菌计数。

无菌条件下切取膝关节的关节囊和滑膜，称重、匀浆后经过TSB连续稀释，去稀释液接种至TSA板，在37℃培养24小时后进行菌落计数，实验重复三次进行细菌计数。通过计算确定样品每克组织含有的菌落数。

UHMWPE垫圈同样使用磷酸盐缓冲液淋洗3次，每一个垫圈被保存在固定剂(2.5%戊二醛) 24小时，按照前面标本做扫描电子显微镜前的处理方法处理标本，

59

随机选择观察区域作扫描电子显微镜观察。

### 1.5 统计分析

使用SPSS 17.0软件做统计分析。数据表示为均数±标准差。生物膜细菌计数使用单因素方差分析评估，P＜0.05被认为是具有统计学意义。

## **2** 结果

利用兔膝关节PJI模型中，我们评估了使用抗生素联合生物膜抑制剂灌洗感染后对假体表面生物膜形成和细菌数量的影响。通过对于高分子聚乙烯材料表面的扫描电子显微镜观察，直观地观察了生物膜和细菌数量的变化。生理盐水组（图5-4a），可见大量的生物膜和大量堆积的细菌；万古霉素组可见有较多的生物膜和一些镶嵌在生物膜内的细菌（图5-4b）；大蒜素组的细菌生物膜的形成显著减少，但仍然可见大量细菌存在（图5-4c）；万古霉素联合大蒜素治疗组几乎无可见的生物膜，只有零星的细菌被发现（图5-4d）。



图5-4a，生理盐水灌洗组，可见大量的生物膜和大量堆积的细菌，图5-4b万古霉素灌洗组，可见有较多的生物膜和一些镶嵌在生物膜内的细菌图5-4c，大蒜素灌洗组，细菌生物膜的形成显著减少，可见大量细菌存在，图5-4d万古霉素联合大蒜素灌洗组，几乎无可见的生物膜，只有零星的细菌

假体表面的细菌计数进一步证实了电镜发现，螺钉的超声洗脱液细菌计数

（图5-5），各组之间有显著差异（F = 71.14, P,71.14）。生理盐水（A组），万古霉素（B组），大蒜素（C组），万古霉素和蒜素组（D组）的细菌计数（表示为log10CFU

/毫升）分别为4.94±0.72、4.13±0.95，4.45±0.63和2.88±0.56。的是万古

霉素联合大蒜素灌洗组细菌计数最低明显低于其它组（P＜0.01）。

60



图5-5为螺钉表面细菌计数(log10CFU /毫升)直方图，A组为生理盐水灌洗组，细菌计数为4.94±0.72；B组为万古霉素灌洗组，细菌计数为4.13±0.95；C组为大蒜素灌洗组，细菌计数为4.45±0.63；D组为万古霉素联合大蒜素组灌洗组，细菌计数为2.88±0.56。万古霉素联合大蒜素灌洗组细菌计数最低。

各组软组织细菌计数（图5-6），生理盐水（A组），万古霉素（B组），蒜素（C组），万古霉素和蒜素组（D组）的细菌计数（表示为log10CFU /毫升）分别为

4.90±0.79、4.49±0.74，4.01±0.77和3.85±0.96。万古霉素联合大蒜素灌

洗组细菌计数最低，但仅在生理盐水组与万古霉素组、生理盐水组与大蒜素联合万古霉素组间差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。而在万古霉素组合大蒜素联合万古霉素在之间差异没有统计学意义（*P*﹥0.05），在大蒜素组与生理盐水组之间差异没有统计学意义（*P*﹥0.05）。

61



图5-6 为软组织细菌计数(log10CFU /毫升)直方图，A组为生理盐水灌洗组, 细菌计数为

4.90±0.79；B组为万古霉素灌洗组，细菌计数为4.49±0.74；C组为大蒜素灌洗组，细菌计数为4.01±0.77；D组为万古霉素联合大蒜素组灌洗组，细菌计数为3.85±0.96。万古霉素联合大蒜素灌洗组细菌计数最低，在生理盐水组与万古霉素组、生理盐水组与大蒜素联合万古霉素组之间差异具有统计学意义，*P*＜0.05。而在万古霉素组与大蒜素联合万古霉素组在之间差异没有统计学意义，*P*﹥0.05，在大蒜素组与生理盐水组之间差异没有统计学意义，P﹥0.05

## **3** 讨论

对于人工关节置换术来说，生物膜型感染是一种灾难性的并发症，生物膜内的细菌对于抗生素的抵抗力是浮游菌的100-1000倍[140]。为了提高抗菌药物对生物膜内细菌的杀菌作用，抑制细菌粘附和生物膜的形成是一项有效的策略。最近，体外实验研究表明，大蒜素可以抑制细菌粘附和聚集并能阻止生物膜的形成[145,

146]，但大蒜素联合万古霉素对生物膜型治疗PJI的体内实验尚未见报道。在我们的研究中，我们评估关节内大蒜素联合万古霉素灌洗治疗PJI兔模型的有效性。结果显示，大蒜素在体内可以抑制人工关节假体表面生物膜的形成，大蒜素联合万古霉素有效地杀死生物膜内细菌。而对于关节周围软组织而言，单独使用万古霉素和万古霉素联合大蒜素的杀菌效果相似，单独使用大蒜素对感染关节周围软组织没有明显的杀菌作用，这说明在软组织中发挥抗菌作用的药物是大蒜素，其原因是软组织中的细菌是浮游菌，万古霉素可以有效发挥杀菌作用，而大蒜素没有杀菌作用，只有抑菌作用。

62

与生理盐水灌洗组相比较，大蒜素联合万古霉素灌洗组对兔假体表面生物膜菌具有显著的杀菌能力，这一个结果从假体表面的细菌计数和扫描电子显微镜图像均得到证实。对于上述的结果我们可以从以下几个方面来解释。首先，生物膜的形成和发展是一个动态的过程[142, 149]，通常这一过程是细菌从崩解的生物膜释放出来，播散到假体其它部分并粘附在假体上形成新的生物膜；在大蒜素存在时，这些自生物膜释放出来的细菌（本实验为表皮葡萄球菌）便不能再发生粘附和聚集于关节假体表面[24]，它们呈浮游菌状态存在于关节腔内，很容易被抗生素（本实验为万古霉素）杀灭。其次，抗生素对于生物膜的渗透是呈浓度递减的形式，处于浅层的细菌较为活跃，对抗生素也较敏感。也就是说，对于处于生物膜浅层的生物膜内菌，抗生素是有杀灭作用的[150]。在大蒜素的存在情况下，新的生物膜不能及时形成，生物膜逐渐变“薄”，随着浅层的生物膜菌逐渐被杀灭，原来处于深层的生物膜菌逐渐成为生物膜浅层的生物膜菌，它们由于可以获得较好的营养条件而呈现活跃状态，所以更容易被抗生素杀灭。从电子扫描显微镜图像可以发现，在含有大蒜素灌洗组中，生物膜较少。这一体内试验结果和先前的体外实验结果是一致的[145, 146]。大蒜素组超声洗脱液的细菌数略低于生理盐水和万古霉素组（图4-2），这可能是由于大蒜素阻止了假体表面细菌形成生物膜，导致残存的生物膜内细菌的减少所致。万古霉素组的细菌计数比生理盐水组少，这提示了万古霉素对于生物膜内菌有弱的杀灭作用，这也符合抗生素能杀灭浅层生物膜内菌的理论。另外可能和我们灌洗治疗时间仅有3天（灌洗时间的选择在后文讨论）也有关系。

生物膜的形成机制是复杂的，大蒜素抑制生物膜的形成的机理目前仍然知之甚少。然而，我们的研究结果第一次反映了大蒜素在关节内抑制表皮葡萄球菌在假体表面生物膜的形成，先前的研究只证实了大蒜素体外抑制表皮葡萄球菌生物膜形成的作用。

大蒜素联合万古霉素关节内的灌洗可能是治疗表皮葡萄球菌引起的PJI的抗感染治疗的策略。生物膜在PJI发病机制中扮演一个重要的角色，成功治疗

PJI必须根除生物膜菌赖以存在的生物膜[116, 136]。清除保留假体的PJI治疗方案是目前较为保守的治疗策略，在选择适合的病例前提下治愈率大约在80%左右[151]，

63

这一结果比一期和二期置换方案均低[9]。对于内置物相关的感染，若单独使用抗生素，即使是对感染菌敏感的抗生素，其细菌的清除率都较低，因为单独使用抗生素并不能清除假体表面的生物膜[9]。临床上如果全身性应用抗生素在关节腔内是很难达到细菌的最小抑菌浓度（MIC）[152]。通过使用灌洗这种给药方式，关节内的抗生素浓度可以有效的保证。我们推测，大蒜素联合万古霉素灌洗治疗表皮葡萄球菌引起的PJI可以改善保留假体治疗方案的治愈率。

理论上，灌洗时间越长，清除假体表面的生物膜菌越彻底。但灌洗时间的延长又会增加外源性感染的风险，我们的实验必须在观察到大蒜素发挥有效的抗生物膜作用和防止外源性感染之间找到最佳的时间点。有文献报道，关节灌洗治疗持续的时间可以在2-6天之间[153]，所以我们选择了3天时间的持续灌洗治疗。关节内灌洗治疗可以将关节内感染，可将各种肉眼可见的或肉眼不能发现的各种感染残留物清除体外，是各种关节化脓性感染的常见治疗手段[154-158]，现已有报道将此方法应用到PJI的治疗中[159-163]。持续灌洗治疗可以有效降低植入材料表面细菌量[164]，还能够使关节腔内保持有效的抗生素浓度，我们的实验也证明了这一理论。

104CUFS表皮葡萄球菌接种到兔关节腔，扫描电镜结果提出大量生物膜形成。我们相信这已经真正反映了临床PJI情况，如果一个更高剂量的细菌接种，可能导致伤口不裂开、窦道形成等并发症出现。在这项研究中的动物模型的关节内植入材料通常用于人体人工关节置换术，该动物模型适用于有关PJI药物疗效的研究，不适合其他人工关节相关的研究，如人工关节松动。所以开发新的人工关节假体动物模型以便更接近人类的人工关节是必要的。

还需要进一步的研究来确定大蒜素可以抑制其它细菌产生的生物膜。在这项研究中，植入物表面上的生物膜很难量化，这在今后的研究中需要改进。未来的工作还应该包括大蒜素结合万古霉素的全身性给药治疗PJI来验证他们的协同效应，因为全身性给药引起的外源性感染的风险更低。

总之，我们的研究结果显示，大蒜素在体内可以抑制表皮葡萄球菌生物膜形成，大蒜素可以增强万古霉素的杀灭生物膜内菌作用。大蒜素与万古霉素的联合使用有希望成为治疗表皮葡萄球菌引起的PJI新的抗感染治疗的策略。

64

# 全文总结与展望

1. 在体外实验中亚抑菌浓度的大蒜素（4mg/L）可以抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成。

2. 亚抑菌浓度大蒜素抑制了表皮葡萄球菌生物膜的胞外多糖粘附素，阻止了细菌在UHMWPE和钛合金材料表面的粘附、聚集，进而减少了生物膜的形成。

3. 亚抑菌浓度大蒜素可能是通过降低正调控基因icaA和SigB的表达和增加负调控基因icaR和luxS的表达来减少表皮葡萄球菌生物膜中PIA的产生。

4. 亚抑菌浓度大蒜素联合万古霉素在体外可以有效杀灭表皮葡萄球菌生物膜内细菌。这位临床使用大蒜素治疗人工关节感染提供了有力的支持。

5. 亚抑菌浓度大蒜素联合万古霉素灌洗兔人工关节假体感染模型，有效杀灭了假体表面生物膜菌；对于感染假体周围软组织也有杀灭作用，这可能是万古霉素在关节滑膜和关节囊的局部到有效杀菌浓度所发挥作用。

6.对于人工关节感染采用清除保留假体这一治疗策略，若在此基础之上，联合大蒜素使用或许能提高治愈率和降低复发率。当然对于全身性用药后，在关节假体表面是否达到抗生物膜的药物浓度则需要进一步的实验研究，另外，大蒜素对于感染假体周围软组织疾病免疫的影响尚需要开展相关研究。

7.我们实验研究是针对表皮葡萄球菌，大蒜素对于其它能产生生物膜的细菌是否也同样具有抗生物膜作用需要新的实验来给于证明。

65

参考文献

[1] Laupacis A, Bourne R, Rorabeck C, et al. The effect of elective total hip replacement on health-related quality of life. J Bone Joint Surg Am, 1993, 75(11): 1619-26.

[2] Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, et al. Molecular and antibiofilm(反生物膜) approaches toprosthetic joint infection. Clin Orthop Relat Res, 2003, (414): 69-88.

[3] Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(2): 302-45.

[4] Havelin LI, Fenstad AM, Salomonsson R, et al. The Nordic Arthroplasty Register Association: a unique collaboration between 3 national hip arthroplasty registries with 280, 201 THRs. Acta Orthop, 2009, 80(4): 393-401.

[5] Kurtz SM, Lau E, Watson H, et al. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. J Arthroplasty, 2012, 27(8 Suppl): 61-5. e1.

[6] Kurtz S, Ong K, Lau E, et al. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. J Bone Joint Surg Am, 2007, 89(4): 780-5.

[7] Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annu Rev Med, 2013, 64: 175-88.

[8] Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, et al. Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. Future Microbiol, 2011, 6(11): 1329-49.

[9] Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(2): 158-68.

[10] Esteban J, Cordero-Ampuero J. Treatment of prosthetic osteoarticular infections. Expert Opin Pharmacother, 2011, 12(6): 899-912.

[11] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 1999, 284(5418): 1318-22.

[12] Shih PC, Huang CT. Effects of quorum-sensing deficiency on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(2): 309-14.

[13] Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. Int J Artif Organs, 2005, 28(11): 1062-8.

[14] von EC, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis, 2002, 2(11): 677-85.

[15] Peel TN, Cheng AC, Buising KL, et al. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(5): 2386-91.

[16] Nayak N, Satpathy G, Nag HL, et al. Slime production is essential for the adherence of Staphylococcus epidermidis in implant-related infections. J Hosp Infect, 2011, 77(2): 153-6.

[17] Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. Future Microbiol, 2010, 5(6): 917-33.

[18] Mah TF, Pitts B, Pellock B, et al. A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance. Nature, 2003, 426(6964): 306-10.

[19] Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev, 1994, 7(1): 117-40.66

[20] Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect, 1999, 1(2): 125-9.

[21] Barone FE, Tansey MR. Isolation, purification, identification, synthesis, and kinetics of activity of the anticandidal component of Allium sativum, and a hypothesis for its mode of action. Mycologia, 1977, 69(4): 793-825.

[22] Coppi A, Cabinian M, Mirelman D, et al. Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(5): 1731-7.

[23] Fujisawa H, Watanabe K, Suma K, et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(9): 1948-55.

[24] Perez-Giraldo C, Cruz-Villalon G, Sanchez-Silos R, et al. In vitro activity of allicin against Staphylococcus epidermidis and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation. J Appl Microbiol, 2003, 95(4): 709-11.

[25] Khodavandi A, Harmal NS, Alizadeh F, et al. Comparison between allicin and fluconazole in Candida albicans biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression. Phytomedicine, 2011, 19(1): 56-63.

[26] Lihua L, Jianhuit W, Jialini Y, et al. Effects of allicin on the formation of Pseudomonas aeruginosa biofinm and the production of quorum-sensing controlled virulence factors. Pol J Microbiol, 2013, 62(3): 243-51.

[27] Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, et al. Enzymatic detachment of Staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2633-6.

[28] Wu X, Wang Y, Tao L. Sulfhydryl compounds reduce Staphylococcus aureus biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. FEMS Microbiol Lett, 2011, 316(1): 44-50.

[29] Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med, 2004, 351(16): 1645-54.

[30] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 1999, 284(5418): 1318-22.

[31] Murdoch DR, Roberts SA, Fowler JVG Jr, et al. Infection of orthopedic prostheses after Staphylococcus aureus bacteremia. Clin Infect Dis, 2001, 32(4): 647-9.

[32] Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. Curr Infect Dis Rep, 2008, 10(5): 394-403.

[33] Garcia-Oltra E, Garcia-Ramiro S, Martinez JC, et al. [Prosthetic joint infection by Candida spp.]. Rev Esp Quimioter, 2011, 24(1): 37-41.

[34] Langlais F. Can we improve the results of revision arthroplasty for infected total hip replacement. J Bone Joint Surg Br, 2003, 85(5): 637-40.

[35] Engesaeter LB, Dale H, Schrama JC, et al. Surgical procedures in the treatment of 784 infected THAs reported to the Norwegian Arthroplasty Register. Acta Orthop, 2011, 82(5): 530-7.

[36] Beswick AD, Elvers KT, Smith AJ, et al. What is the evidence base to guide surgical treatment of infected hip prosthesessystematicreviewoflongitudinalstudiesinunselectedpatients. BMCMed, 2012, 10: 18.

[37] Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, et al. Staphylococcus aureus prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. Clin Infect Dis, 1997, 24(5): 914-9.

[38] Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, et al. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(5): 433-9.

[39] Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, et al. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. J Infect Dis, 1990, 162(1): 96-102.

[40] Widmer AF, Wiestner A, Frei R, et al. Killing of nongrowing and adherent Escherichia coli determines

67

Drug efficacy in device-related infections. Antimicrob Agents Chemother, 1991,35(4):741-6.

[41] Forrest GN, Tamura K. Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1): 14-34.

[42] Nimmo GR, Pearson JC, Collignon PJ, et al. Prevalence of MRSA among Staphylococcus aureus isolated from hospital inpatients, 2005: report from the Australian Group for Antimicrobial Resistance. Commun Dis Intell Q Rep, 2007, 31(3): 288-96.

[43] Aboltins CA, Page MA, Buising KL, et al. Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement, prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(6): 586-91.

[44] Segreti J, Nelson JA, Trenholme GM. Prolonged suppressive antibiotic therapy for infected orthopedic prostheses. Clin Infect Dis, 1998, 27(4): 711-3.

[45] Soriano A, Gomez J, Gomez L, et al. Efficacy and tolerability of prolonged linezolid therapy in the treatment of orthopedic implant infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(5): 353-6.

[46] Rao N, Regalla DM. Uncertain efficacy of daptomycin for prosthetic joint infections: a prospective case series. Clin Orthop Relat Res, 2006, 451: 34-7.

[47] John AK, Baldoni D, Haschke M, et al. Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus: importance of combination with rifampin. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(7): 2719-24.

[48] Furustrand TU, Corvec S, Betrisey B, et al. Role of rifampin against Propionibacterium acnes biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(4): 1885-91.

[49] Holmberg A, Morgelin M, Rasmussen M. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against Enterococcus faecalis in biofilms. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(2): 433-9.

[50] Hsieh PH, Lee MS, Hsu KY, et al. Gram-negative prosthetic joint infections: risk factors and outcome of treatment. Clin Infect Dis, 2009, 49(7): 1036-43.

[51] Aboltins CA, Dowsey MM, Buising KL, et al. Gram-negative prosthetic joint infection treated with debridement, prosthesis retention and antibiotic regimens including a fluoroquinolone. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(6): 862-7.

[52] Uppuluri P, Srinivasan A, Ramasubramanian A, et al. Effects of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin on Candida albicans biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(7): 3591-3.

[53] Perez-Giraldo C, Cruz-Villalon G, Sanchez-Silos R, et al. In vitro activity of allicin against Staphylococcus epidermidis and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation. J Appl Microbiol, 2003, 95(4): 709-11.

[54] Cruz-Villalon G, Perez-Giraldo C. Effect of allicin on the production of polysaccharide intercellular adhesin in Staphylococcus epidermidis. J Appl Microbiol, 2011, 110(3): 723-8.

[55] Mack D, Becker P, Chatterjee I, et al. Mechanisms of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. Int J Med Microbiol, 2004, 294(2-3): 203-12.

[56] von EC, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis, 2002, 2(11): 677-85.

[57] Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, et al. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. Clin Infect Dis, 2003, 36(9): 1103-10.68

[58] Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev, 1994, 7(1): 117-40.

[59] Gotz F. Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol, 2002, 43(6): 1367-78.

[60] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet, 2001, 358(9276): 135-8.

[61] Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke MC, et al. Allicin: chemistry and biological properties. Molecules, 2014, 19(8): 12591-618.

[62] Ali M, Al-Qattan KK, Al-Enezi F, et al. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2000, 62(4): 253-9.

[63] Fukao T, Hosono T, Misawa S, et al. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. Food Chem Toxicol, 2004, 42(5): 743-9.

[64] Tsao SM, Hsu CC, Yin MC. Garlic extract and two diallyl sulphides inhibit methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in BALB/cA mice. J Antimicrob Chemother, 2003, 52(6): 974-80.

[65] Velliyagounder K, Ganeshnarayan K, Velusamy SK, et al. In vitro efficacy of diallyl sulfides against the periodontopathogen Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(5): 2397-407.

[66] Otto M. Staphylococcal biofilms. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 322: 207-28.

[67] Teichberg S, Farber BF, Wolff AG, et al. Salicylic acid decreases extracellular biofilm production by Staphylococcus epidermidis: electron microscopic analysis. J Infect Dis, 1993, 167(6): 1501-3.

[68] Lu Q, Yu J, Yang X, et al. Ambroxol interferes with Pseudomonas aeruginosa quorum sensing. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(3): 211-5.

[69] Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect, 1999, 1(2): 125-9.

[70] Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, et al. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. Biochim Biophys Acta, 1998, 1379(2): 233-44.

[71] Lihua L, Jianhuit W, Jialini Y, et al. Effects of allicin on the formation of Pseudomonas aeruginosa biofinm and the production of quorum-sensing controlled virulence factors. Pol J Microbiol, 2013, 62(3): 243-51.

[72] Cao Y, Dai B, Wang Y, et al. In vitro activity of baicalein against Candida albicans biofilms. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(1): 73-7.

[73] Zeng Z, Qian L, Cao L, et al. Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79(1): 119-26.

[74] Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, et al. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin. J Biol Chem, 1998, 273(29): 18586-93.

[75] Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54881-6.

[76] O'Gara JP. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett, 2007, 270(2): 179-88.

[77] Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. Regulation of icaR gene expression in Staphylococcus epidermidis. FEMS Microbiol Lett, 2002, 216(2): 171-7.

[78] Vuong C, Gerke C, Somerville GA, et al. Quorum-sensing control of biofilm factors in Staphylococcus epidermidis. J Infect Dis, 2003, 188(5): 706-18.

[79] Nickel JC, Wright JB, Ruseska I, et al. Antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa colonizing a urinary catheter in vitro. Eur J Clin Microbiol, 1985, 4(2): 213-8.69

[80] Khardori N, Yassien M, Wilson K. Tolerance of Staphylococcus epidermidis grown from indwelling vascular catheters to antimicrobial agents. J Ind Microbiol, 1995, 15(3): 148-51.

[81] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol, 1995, 49: 711-45.

[82] Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, et al. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to Staphylococcus aureus biofilms. Infect Immun, 2002, 70(11): 6339-45.

[83] Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol, 2001, 9(1): 34-9.

[84] Keren I, Kaldalu N, Spoering A, et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. FEMS Microbiol Lett, 2004, 230(1): 13-8.

[85] Rodgers J, Phillips F, Olliff C. The effects of extracellular slime from Staphylococcus epidermidis on phagocytic ingestion and killing. FEMS Immunol Med Microbiol, 1994, 9(2): 109-15.

[86] Nayak N, Satpathy G, Nag HL, et al. Slime production is essential for the adherence of Staphylococcus epidermidis in implant-related infections. J Hosp Infect, 2011, 77(2): 153-6.

[87] Szczuka E, Telega K, Kaznowski A. Biofilm formation by Staphylococcus hominis strains isolated from human clinical specimens. Folia Microbiol (Praha), 2015, 60(1): 1-5.

[88] Mack D, Fischer W, Krokotsch A, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J Bacteriol, 1996, 178(1): 175-83.

[89] Mack D, Haeder M, Siemssen N, et al. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. J Infect Dis, 1996, 174(4): 881-4.

[90] Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54881-6.

[91] Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, et al. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin. J Biol Chem, 1998, 273(29): 18586-93.

[92] Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54881-6.

[93] Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. Mol Microbiol, 1996, 20(5): 1083-91.

[94] O'Gara JP. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett, 2007, 270(2): 179-88.

[95] Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis. J Bacteriol, 2002, 184(16): 4400-8.

[96] Jager S, Jonas B, Pfanzelt D, et al. Regulation of biofilm formation by sigma B is a common mechanism in Staphylococcus epidermidis and is not mediated by transcriptional regulation of sarA. Int J Artif Organs, 2009, 32(9): 584-91.

[97] Xu L, Li H, Vuong C, et al. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of Staphylococcus epidermidis. Infect Immun, 2006, 74(1): 488-96.

[98] Peters G, Locci R, Pulverer G. Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B, 1981, 173(5): 293-9.70

[99] Zilberman M, Elsner JJ. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. J Control Release, 2008, 130(3): 202-15.

[100] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(2): 114-22.

[101] Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. Biomatter, 2012, 2(4): 176-94.

[102] Harris LG, Tosatti S, Wieland M, et al. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine) -grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. Biomaterials, 2004, 25(18): 4135-48.

[103] Bayston R, Rodgers J. Production of extra-cellular slime by Staphylococcus epidermidis during stationary phase of growth: its association with adherence to implantable devices. J Clin Pathol, 1990, 43(10): 866-70.

[104] Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. Eur Cell Mater, 2004, 8: 37-57.

[105] An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. J Biomed Mater Res, 1998, 43(3): 338-48.

[106] Martins MC, Wang D, Ji J, et al. Albumin and fibrinogen adsorption on cibacron blue F3G-A immobilised onto PU-PHEMA (polyurethane-poly(hydroxyethylmethacrylate)) surfaces. J Biomater Sci Polym Ed, 2003, 14(5): 439-55.

[107] Grenho L, Manso MC, Monteiro FJ, et al. Adhesion of Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Pseudomonas aeruginosa onto nanohydroxyapatite as a bone regeneration material. J Biomed Mater Res A, 2012, 100(7): 1823-30.

[108] Extremina CI, Fonseca AF, Granja PL, et al. Anti-adhesion and antiproliferative cellulose triacetate membrane for prevention of biomaterial-centred infections associated with Staphylococcus epidermidis. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(2): 164-8.

[109] Isberg RR, Barnes P. Dancing with the host; flow-dependent bacterial adhesion. Cell, 2002, 110(1): 1-4.

[110] Klapper I, Rupp CJ, Cargo R, et al. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. Biotechnol Bioeng, 2002, 80(3): 289-96.

[111] Katsikogianni MG, Missirlis YF. Interactions of bacteria with specific biomaterial surface chemistries under flow conditions. Acta Biomater, 2010, 6(3): 1107-18.

[112] Li YH, Hanna MN, Svensater G, et al. Cell density modulates acid adaptation in Streptococcus mutans: implications for survival in biofilms. J Bacteriol, 2001, 183(23): 6875-84.

[113] Extremina CI, Fonseca AF, Granja PL, et al. Anti-adhesion and antiproliferative cellulose triacetate membrane for prevention of biomaterial-centred infections associated with Staphylococcus epidermidis. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(2): 164-8.

[114] Kohnen W, Kolbenschlag C, Teske-Keiser S, et al. Development of a long-lasting ventricular catheter impregnated with a combination of antibiotics. Biomaterials, 2003, 24(26): 4865-9.

[115] Scheuerman TR, Camper AK, Hamilton MA. Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. J Colloid Interface Sci, 1998, 208(1): 23-33.

[116] Peel TN, Buising KL, Choong PF. Diagnosis and management of prosthetic joint infection. Curr Opin Infect Dis, 2012, 25(6): 670-6.

[117] Cremieux AC, Carbon C. Experimental models of bone and prosthetic joint infections. Clin Infect Dis, 1997, 25(6): 1295-302.71

[118] Brady RA, O'May GA, Leid JG, et al. Resolution of Staphylococcus aureus biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. Infect Immun, 2011, 79(4): 1797-803.

[119] Monzon M, Garcia-Alvarez F, Lacleriga A, et al. Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. Acta Orthop Scand, 2002, 73(1): 11-9.

[120] Donlan RM. New approaches for the characterization of prosthetic joint biofilms. Clin Orthop Relat Res, 2005, (437): 12-9.

[121] Balaban N, Stoodley P, Fux CA, et al. Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. Clin Orthop Relat Res, 2005, (437): 48-54.

[122] Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J Clin Invest, 2003, 112(10): 1466-77.

[123] Belmatoug N, Cremieux AC, Bleton R, et al. A new model of experimental prosthetic joint infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a microbiologic, histopathologic, and magnetic resonance imaging characterization. J Infect Dis, 1996, 174(2): 414-7.

[124] An YH, Bradley J, Powers DL, et al. The prevention of prosthetic infection using a cross-linked albumin coating in a rabbit model. J Bone Joint Surg Br, 1997, 79(5): 816-9.

[125] Sheehan E, McKenna J, Mulhall KJ, et al. Adhesion of Staphylococcus to orthopaedic metals, an in vivo study. J Orthop Res, 2004, 22(1): 39-43.

[126] Kurtz SM, Ong KL, Lau E, et al. Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population. Clin Orthop Relat Res, 2010, 468(1): 52-6.

[127] Barrett J, Losina E, Baron JA, et al. Survival following total hip replacement. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(9): 1965-71.

[128] Del PJL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. N Engl J Med, 2009, 361(8): 787-94.

[129] Kurtz SM, Lau E, Ong K, et al. Future young patient demand for primary and revision joint replacement: national projections from 2010 to 2030. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(10): 2606-12.

[130] Iarikov D, Demian H, Rubin D, et al. Choice and doses of antibacterial agents for cement spacers in treatment of prosthetic joint infections: review of published studies. Clin Infect Dis, 2012, 55(11): 1474-80.

[131] Bradbury T, Fehring TK, Taunton M, et al. The fate of acute methicillin-resistant Staphylococcus aureus periprosthetic knee infections treated by open debridement and retention of components. J Arthroplasty, 2009, 24(6 Suppl): 101-4.

[132] Parvizi J, Azzam K, Ghanem E, et al. Periprosthetic infection due to resistant staphylococci: serious problems on the horizon. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(7): 1732-9.

[133] Odum SM, Fehring TK, Lombardi AV, et al. Irrigation and debridement for periprosthetic infections: does the organism matter. J Arthroplasty, 2011, 26(6 Suppl): 114-8.

[134] Parvizi J, Adeli B, Zmistowski B, et al. Management of periprosthetic joint infection: the current knowledge: AAOS exhibit selection. J Bone Joint Surg Am, 2012, 94(14): e104.

[135] Zmistowski B, Fedorka CJ, Sheehan E, et al. Prosthetic joint infection caused by gram-negative organisms. J Arthroplasty, 2011, 26(6 Suppl): 104-8.

[136] Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med, 2004, 351(16): 1645-54.

[137] Beswick AD, Elvers KT, Smith AJ, et al. What is the evidence base to guide surgical treatment of infected hip prosthesessystematicreviewoflongitudinalstudiesinunselectedpatients. BMCMed, 2012, 10: 18.

[138] Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. FEMS

72

Immunol Med Microbiol, 2012,65(2):158-68.

[139] Gallo J, Kolar M, Novotny R, et al. Pathogenesis of prosthesis-related infection. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2003, 147(1): 27-35.

[140] Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. Clin Infect Dis, 2001, 33 Suppl 2: S94-106.

[141] del PJL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. Clin Pharmacol Ther, 2007, 82(2): 204-9.

[142] Yang L, Hu Y, Liu Y, et al. Distinct roles of extracellular polymeric substances in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Environ Microbiol, 2011, 13(7): 1705-17.

[143] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 1999, 284(5418): 1318-22.

[144] Arciola CR, Montanaro L, Costerton JW. New trends in diagnosis and control strategies for implant infections. Int J Artif Organs, 2011, 34(9): 727-36.

[145] Cruz-Villalon G, Perez-Giraldo C. Effect of allicin on the production of polysaccharide intercellular adhesin in Staphylococcus epidermidis. J Appl Microbiol, 2011, 110(3): 723-8.

[146] Perez-Giraldo C, Cruz-Villalon G, Sanchez-Silos R, et al. In vitro activity of allicin against Staphylococcus epidermidis and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation. J Appl Microbiol, 2003, 95(4): 709-11.

[147] Isiklar ZU, Darouiche RO, Landon GC, et al. Efficacy of antibiotics alone for orthopaedic device related infections. Clin Orthop Relat Res, 1996, (332): 184-9.

[148] Malloy KM, Davis GA. Summary of ASHP/IDSA/SIDP vancomycin monitoring recommendations: a focus on osteomyelitis. Orthopedics, 2009, 32(7): 499.

[149] Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiol, 2009, 17(2): 73-87.

[150] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 999-1007.

[151] Shuman EK, Urquhart A, Malani PN. Management and prevention of prosthetic joint infection. Infect Dis Clin North Am, 2012, 26(1): 29-39.

[152] Haerdi-Landerer MC, Habermacher J, Wenger B, et al. Slow release antibiotics for treatment of septic arthritis in large animals. Vet J, 2010, 184(1): 14-20.

[153] Parisien JS, Shaffer B. Arthroscopic management of pyarthrosis. Clin Orthop Relat Res, 1992, (275): 243-7.

[154] Chaudhry H, Madden K, Bhandari M. Cochrane in CORR (R): Joint lavage for osteoarthritis of the knee. Clin Orthop Relat Res, 2014, 472(1): 22-7.

[155] Meijer MC, van Weeren PR, Rijkenhuizen AB. Clinical experiences of treating septic arthritis in the equine by repeated joint lavage: a series of 39 cases. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 2000, 47(6): 351-65.

[156] Manadan AM, Block JA. Daily needle aspiration versus surgical lavage for the treatment of bacterial septic arthritis in adults. Am J Ther, 2004, 11(5): 412-5.

[157] Dodwell ER. Osteomyelitis and septic arthritis in children: current concepts. Curr Opin Pediatr, 2013, 25(1): 58-63.

[158] Vos LM, Huddleston SJJ, Stegenga B. Lavage therapy versus nonsurgical therapy for the treatment of arthralgia of the temporomandibular joint: a systematic review of randomized controlled trials. J Orofac Pain, 2013, 27(2): 171-9.

[159] Lettin AW, Neil MJ, Citron ND, et al. Excision arthroplasty for infected constrained total knee

73

Replacements. J Bone Joint Surg Br, 1990,72(2):220-4.

[160] Mella-Schmidt C, Steinbrink K. [Value of irrigation-suction drainage in the treatment of early infection of joint implants]. Chirurg, 1989, 60(11): 791-4.

[161] Tsumura H, Ikeda S, Ono T, et al. Synovectomy, debridement, and continuous irrigation for infected total knee arthroplasty. Int Orthop, 2005, 29(2): 113-6.

[162] Kirr R, Wiberg J, Hertlein H. [Clinical experience and results of using the V. A. C. instill therapy in infected hip- and knee prosthetics]. Zentralbl Chir, 2006, 131 Suppl 1: S79-82.

[163] Brown NM, Cipriano CA, Moric M, et al. Dilute betadine lavage before closure for the prevention of acute postoperative deep periprosthetic joint infection. J Arthroplasty, 2012, 27(1): 27-30.

[164] Bahrs C, Schnabel M, Frank T, et al. Lavage of contaminated surfaces: an in vitro evaluation of the effectiveness of different systems. J Surg Res, 2003, 112(1): 26-30.

74

# 综述

**人工关节感染的发病机制、诊断和治疗**

人工关节置换关节手术已经成为关节外科的一种常见的手术，它能够显著提高患者的生存质量。随着社会人口老龄化的出现，在未来20年对该手术的需求将会显著增加[1]。尽管人工关节具有各方面的优势，但是同其它骨科植入物一样，最重要的一个问题被感染，虽然这个手术假体感染率仅为1-3％，但它是一种破坏性很强的并发症[2, 3]，同时，治疗这种并发症将会跟病人和社会带来巨大的花费[4-6]。

理解人工关节假体感染（PJI）的诊断和治疗需要对它的发病机制有深刻的认识，尤其是致病菌产生生物膜这一重要过程。早期明确诊断和选择最佳的治疗方案，能够减轻病人的痛苦和获得较好的效果。本文将对目前PJI的发病机制、诊断和治疗的认识进行综述。

**发病机制**

病原菌主要通过两种机制导致PJI的发生，一是手术过程中接种到假体上，另一种是手术之后血源性转移种植到假体上[7]。当致病微生物粘附在假体上后，其表型发生变化，成为无柄细菌形式并分泌细胞外基质，细菌和细胞外基质组成生物膜[8]。生物膜的存在对PJI的诊断和治疗有着深远的影响。

**致病微生物**

葡萄球菌是PJI最常见的致病菌，大约1/4 PJI的发生是由金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌引起的，革兰氏阴性菌单独引起的PJI 的发生率大约在

10%左右[9]，其他微生物包括肠球菌、链球菌和真菌也有报道。**临床分类**

PJI有许多分类系统。按照PJI发生的时间可分为：早期发生（手术后3个月内发生）、延迟发生（手术后3-24个月内发生）、后期发生（手术后大于24个月发生）。血源性假体感染可能发生在任何时间点，更多的可能是在手术后

24个月出现[7, 10]。

早期PJI 通常发生在病人伤口出现并发症、临近原来的手术时间的情况下，延

75

迟和后期发生通常出现缓慢增加人工关节疼痛。血源性PJI通常在人工关节使用数年之久没有任何问题情况下发生，这与其它部位感染有关[11]。

**诊断**

PJI的诊断仍然是关节外科争论的焦点，一个具体的问题是目前缺乏一个被广泛接受金标准来定义人工关节假体感染。现在的定义依赖于大量的参数，包括临床、微生物和组织病理学特征[7, 12-15]，术中样本或在无菌操作下关节内抽吸物的培养对于明确诊断PJI和评价抗生素敏感性非常重要，不同部位的5个样

本保存在不同的无菌容器中，如果从2个或更多个样本中分离出同一细菌，则提示存在PJI[7, 12, 13]。

超声波降解法等技术通过破坏假体材料上的生物膜有助于诊断，研究发现

[16]，使用超声波降解法使细菌培养阳性率从60.8提高到78.5%，尤其是对于术前两周内使用抗生素的患者，声波降解法对于PJI的诊断依然发挥作用。增加3-14天微生物培养时间也会提高诊断的，尤其是对于培养条件较为苛刻的细菌，例如痤疮丙酸杆菌等[17]。

其它实验室检查，如血沉、C反应蛋白有助于PJI的诊断，但同样存在局限性[18]，它们在关节置换后都有升高，C反应蛋白升高可持续3周，血沉升高可持续1年。

关节滑液的分析同样对于诊断PJI有帮助，关节假体感染病人滑液的白血病计数要高于关节假体松动。滑液白细胞总数超过1.7×103/微升诊断PJI的敏感性为94%和特异性为88%，另外，在白细胞分类中中性粒细胞超过65%，对于诊断PJI的敏感性和特异性分别为97和98%[19]，滑液中C反应蛋白检查的特异性和敏感性同血清中C反应蛋白检查相同[20]；白细胞酯酶的快速检测对于PJI诊断的敏感性和特异性分别为80–93.3%和77–100%，但对于此项检测尚存在争议

[21, 22]。

PCR 是一种快速、灵敏的诊断PJI 的诊断方法。一些研究已经通过细菌的16 s rRNA PCR来诊断PJI。这一技术对于检测PJI细菌的敏感性在63%到100%之间[23]。PCR也有其局限性，例如标本或试剂的污染、目前缺乏临床相关研究[24]。突破这些局限性，有使用针对不同的病原微生物的特殊引物和多重PCR的方法开展相关研究[25]。多重PCR使用特定的微生物的引物，并能一次检测多个病原体。

76

在一项超声洗脱液研究中比较多重实时PCR和微生物培养，使用多重PCR使诊断效能从62上升到78%，尤其对于接受了抗生素治疗的患者尤其适用。对于多重PCR最大的制约是微生物的引物，例如目前的商业化的试剂盒中不包括痤疮丙酸杆菌，这些细菌就不能够被测出[26]。针对PJI分离出的病原体来优化组合试剂盒将会提高多重PCR的在PJI诊断中的效用。

放射性核素成像技术，例如骨三相显像检测PJI比较敏感，且具有较高的阴性预测值[27]，然而，骨显像特异性低，关节置换后1年内检测都可以是阳性结果，这就限制了它的应用[28]。18FDG-PET提高了PJI诊断敏感性、特异性和速度，这可能是一项非常有用的诊断方式[28, 29]。由于金属假体影响，使得计算机

断层扫描(CT)和磁共振曾的作用受到限制。然而，新型的CT可以减小这种影响，有利于发现假体周围组织感染异常[28, 30]。

**治疗**

要成功治疗PJI必须消灭生物膜内微生物，同时保留良好的关节功能和生活质量[7]，治疗人工关节假体感染的方案有一期置换或二期置换、截肢、清创术并保留假体(DAR)以及长期抗生素抑制。上述策略中置换和DAR方案满足了

PJI治疗目标[11]。目前还没有随机临床试验比较各种治疗策略，还没有国际一致认可的PJI治疗指南，另外，北美和欧洲的治疗也有着差异[7]。治疗方案的选择应该考虑到一些基本因素，如症状持续时间，植入物的稳定性，患者并发症和感染的类型微生物[11]。

置换需要移除感染的假体和所有的外源性材料，包括骨水泥，切除失活的软组织和骨，在移除感染假体的同时植入新的假体，即为一期置换，经过一段时间的抗生素治疗后，再植入新的假体，此为二期置换。在二期置换间期，植入骨水泥（有或没有抗生素浸渍）间隔，用来帮助维持肢体长度、辅助运动。在一些情况下不主张使用骨水泥间隔，包括一些“难以对付”的病原微生物引起的感染，包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、肠球菌、对多种抗生素耐药的细菌和真菌引起的感染[7, 31]，对于二期置换，对于一般的感染，从切除感染假体到重新植入假体的时间间隔为2-4周，二对于那些“难以对付”的微生物感染则需要8周时间[7, 11]。先前的研究已经暗示一期置换的失败率高于二期置换，

然而，这些研究常为回顾性、单中心、样本少。近期来源于大量注册系统和文

77

献系统评价比较一期和二期置换得出的混杂的结论[32-34]，也就是说，两者孰优孰劣依然不知道。置换手术是治疗迟发性PJI、慢性PJI和假体松动的标准策略[7, 11]，对于一般的感染，一期或二期置换手术后，应用抗生素治疗持续时间为 3

个月；对于二期置换手术治疗“难以对付”的病原微生物，专家意见建议6 周

的抗生素治疗和再植假体手术进一步推迟2周，此时多个术中获得微生物标本

进行培养，针对培养结果，再应用抗生素治疗3个月[11]。

DAR治疗方案包括关节清创，切除感染和坏死组织，更换人工关节衬垫和关节灌洗等联合治疗[11]。早期研究DAR发现复发率很高[35]，在慎重选择病人和使用能够抗生物膜内菌（例如利福平、喹诺酮类抗生素）的抗生素后，DAR的疗效有了非常显著提高[7, 11]。DAR策略中抗生素治疗的持续时间尚未统一。专家意见建议对髋关节PJI使用3个月抗生素，对膝关节PJI使用6个月抗生素。最近的研究报告，对患者治疗3 - 6个月和6个月以上的抗生素，其治疗结果类似[36]。

**抗生素治疗**

通过研究抗生素生物膜内的抗菌活性，发现不同抗生素具有不同的功效。利福平和喹诺酮类药在生物膜内具有良好的活性[37, 38]。在葡萄球菌PJI（特别是采用DAR 策略），利福平是治疗的主要药物[11]。利福平的体外试验有效性结果也已得到临床研究的支持。使用利福平和喹诺酮类抗生素组合的抗生素治疗是成功治疗葡萄球菌PJI的独立预测指标[39]。使用利福平的主要限制是在单独使用利福平是容易产生抵抗作用，也就是说，利福平不能作用一线药物使用[40]。氟喹诺酮类耐药性葡萄球菌越来越多，这限制了利福平-喹诺酮类抗生素组合的效用[41]，选择与利福平组合的药物包括夫西地酸、甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲恶唑或米诺环素[11, 40, 42, 43]。新的药物，如达托霉素和利奈唑胺临床研究的结果是喜忧参半[44, 45]。这些药物只是作为与利福平联合使用的一部分，而不是单一使用的药物[44, 46]。还没有临床研究比较不同药物与利福平联合使用的疗效，除了葡萄球菌PJI，体外实验证明利福平还能抵抗痤疮丙酸杆菌和肠球菌生物膜[47, 48]。

对于革兰氏阴性感染，动物模型实验证明环丙沙星是有效的，然而关于此类病原菌的临床数据非常少[38]。革兰氏阴性感染治疗结果差异很大，特别是DAR的治疗成功率从27到94%[49, 50]，治疗成功与清创术的质量密切相关，特别是

78

在置换过程中，要清除所有失活组织和骨水泥水泥[51]。特别需要关注的是，很多革兰氏阴性菌有诱导产生对喹诺酮类药物产生抵抗作用，尤其是铜绿假单胞菌菌。据此，专家推荐在开始应用喹诺酮类药物治疗前使用2-4周的β-内酰胺抗生素，以减少可能产生的抵抗作用[11]。在白色念珠菌引起的PJI，新的证据表明卡泊芬净比氟康唑在生物膜内有更好的活动[52, 53]。

结 论

随着人口老龄化和关节成形术的日益普及，PJI将继续给临床医生的诊断和治疗带来挑战。PJI患者的最佳治疗方法仍在讨论和研究之中。鉴于相对少的临床病例和需要长时间的随访，需要随机控制试验来研究不同治疗方案。使用大

的注册中心和合作研究组织是PJI进一步发展的关键。这种理解是非常重要的改善病人的预后。

**References**

[1] Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. J Bone Joint Surg Am. 2007. 89(4): 780-5.

[2] Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Bozic KJ, Berry D, Parvizi J. Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population. Clin Orthop Relat Res. 2010. 468(1): 52-6.

[3] Ong KL, Kurtz SM, Lau E, Bozic KJ, Berry DJ, Parvizi J. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. J Arthroplasty. 2009. 24(6 Suppl): 105-9.

[4] Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. J Arthroplasty. 2012. 27(8 Suppl): 61-5. e1.

[5] Peel TN, Dowsey MM, Buising KL, Liew D, Choong PF. Cost analysis of debridement and retention for management of prosthetic joint infection. Clin Microbiol Infect. 2013. 19(2): 181-6.

[6] Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. N Engl J Med. 2004. 350(14): 1422-9.

[7] Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med. 2004. 351(16): 1645-54.

[8] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999. 284(5418): 1318-22.

[9] Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PF. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective. Antimicrob Agents Chemother. 2012. 56(5): 2386-91.

[10] Murdoch DR, Roberts SA, Fowler JVG Jr, et al. Infection of orthopedic prostheses after

79

Staphylococcus aureus bacteremia. Clin Infect Dis. 2001. 32(4): 647-9.

[11] Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. Curr Infect Dis Rep. 2008. 10(5): 394-403.

[12] Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. J Clin Microbiol. 1998. 36(10): 2932-9.

[13] Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. Clin Orthop Relat Res. 2011. 469(11): 2992-4.

[14] Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. N Engl J Med. 2007. 357(7): 654-63.

[15] Mirra JM, Amstutz HC, Matos M, Gold R. The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure. Clin Orthop Relat Res. 1976. (117): 221-40.

[16] Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. N Engl J Med. 2007. 357(7): 654-63.

[17] Schafer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. Clin Infect Dis. 2008. 47(11): 1403-9.

[18] Berbari E, Mabry T, Tsaras G, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. J Bone Joint Surg Am. 2010. 92(11): 2102-9.

[19] Bozic KJ, Ries MD. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. J Bone Joint Surg Am. 2005. 87(8): 1746-51.

[20] Parvizi J, McKenzie JC, Cashman JP. Diagnosis of periprosthetic joint infection using synovial C-reactive protein. J Arthroplasty. 2012. 27(8 Suppl): 12-6.

[21] Parvizi J, Jacovides C, Antoci V, Ghanem E. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme. J Bone Joint Surg Am. 2011. 93(24): 2242-8.

[22] Wetters NG, Berend KR, Lombardi AV, Morris MJ, Tucker TL, Della VCJ. Leukocyte esterase reagent strips for the rapid diagnosis of periprosthetic joint infection. J Arthroplasty. 2012. 27(8 Suppl): 8-11.

[23] De Man FH, Graber P, Luem M, Zimmerli W, Ochsner PE, Sendi P. Broad-range PCR in selected episodes of prosthetic joint infection. Infection. 2009. 37(3): 292-4.

[24] Bauer TW, Parvizi J, Kobayashi N, Krebs V. Diagnosis of periprosthetic infection. J Bone Joint Surg Am. 2006. 88(4): 869-82.

[25] Krimmer V, Merkert H, von EC, et al. Detection of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. J Clin Microbiol. 1999. 37(8): 2667-73.

[26] Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wust J, Trampuz A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. J Clin Microbiol. 2010. 48(4): 1208-14.

[27] Nagoya S, Kaya M, Sasaki M, Tateda K, Yamashita T. Diagnosis of peri-prosthetic infection at the hip using triple-phase bone scintigraphy. J Bone Joint Surg Br. 2008. 90(2): 140-4.

80

[28] Palestro CJ, Love C, Miller TT. Infection and musculoskeletal conditions: Imaging of musculoskeletal infections. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2006. 20(6): 1197-218.

[29] Kwee TC, Kwee RM, Alavi A. FDG-PET for diagnosing prosthetic joint infection: systematic review and metaanalysis. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008. 35(11): 2122-32.

[30] Cyteval C, Hamm V, Sarrabere MP, Lopez FM, Maury P, Taourel P. Painful infection at the site of hip prosthesis: CT imaging. Radiology. 2002. 224(2): 477-83.

[31] Garcia-Oltra E, Garcia-Ramiro S, Martinez JC, et al. [Prosthetic joint infection by Candida spp.]. Rev Esp Quimioter. 2011. 24(1): 37-41.

[32] Langlais F. Can we improve the results of revision arthroplasty for infected total hip replacement. J Bone Joint Surg Br. 2003. 85(5): 637-40.

[33] Engesaeter LB, Dale H, Schrama JC, Hallan G, Lie SA. Surgical procedures in the treatment of 784 infected THAs reported to the Norwegian Arthroplasty Register. Acta Orthop. 2011. 82(5): 530-7.

[34] Beswick AD, Elvers KT, Smith AJ, Gooberman-Hill R, Lovering A, Blom AW. What is the evidence base to guide surgical treatment of infected hip prosthesessystematicreviewoflongitudinalstudiesinunselectedpatients. BMCMed. 2012. 10: 18.

[35] Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, et al. Staphylococcus aureus prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. Clin Infect Dis. 1997. 24(5): 914-9.

[36] Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. Clin Microbiol Infect. 2006. 12(5): 433-9.

[37] Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. J Infect Dis. 1990. 162(1): 96-102.

[38] Widmer AF, Wiestner A, Frei R, Zimmerli W. Killing of nongrowing and adherent Escherichia coli determines drug efficacy in device-related infections. Antimicrob Agents Chemother. 1991. 35(4): 741-6.

[39] Senneville E, Joulie D, Legout L, et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis. 2011. 53(4): 334-40.

[40] Forrest GN, Tamura K. Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. Clin Microbiol Rev. 2010. 23(1): 14-34.

[41] Nimmo GR, Pearson JC, Collignon PJ, et al. Prevalence of MRSA among Staphylococcus aureus isolated from hospital inpatients, 2005: report from the Australian Group for Antimicrobial Resistance. Commun Dis Intell Q Rep. 2007. 31(3): 288-96.

[42] Aboltins CA, Page MA, Buising KL, et al. Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement, prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid. Clin Microbiol Infect. 2007. 13(6): 586-91.

[43] Segreti J, Nelson JA, Trenholme GM. Prolonged suppressive antibiotic therapy for infected orthopedic prostheses. Clin Infect Dis. 1998. 27(4): 711-3.

[44] Soriano A, Gomez J, Gomez L, et al. Efficacy and tolerability of prolonged linezolid therapy in the treatment of orthopedic implant infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.

81

2007. 26(5): 353-6.

[45] Rao N, Regalla DM. Uncertain efficacy of daptomycin for prosthetic joint infections: a prospective case series. Clin Orthop Relat Res. 2006. 451: 34-7.

[46] John AK, Baldoni D, Haschke M, et al. Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus: importance of combination with rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 2009. 53(7): 2719-24.

[47] Furustrand TU, Corvec S, Betrisey B, Zimmerli W, Trampuz A. Role of rifampin against Propionibacterium acnes biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model. Antimicrob Agents Chemother. 2012. 56(4): 1885-91.

[48] Holmberg A, Morgelin M, Rasmussen M. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against Enterococcus faecalis in biofilms. J Antimicrob Chemother. 2012. 67(2): 433-9.

[49] Hsieh PH, Lee MS, Hsu KY, Chang YH, Shih HN, Ueng SW. Gram-negative prosthetic joint infections: risk factors and outcome of treatment. Clin Infect Dis. 2009. 49(7): 1036-43.

[50] Aboltins CA, Dowsey MM, Buising KL, et al. Gram-negative prosthetic joint infection treated with debridement, prosthesis retention and antibiotic regimens including a fluoroquinolone. Clin Microbiol Infect. 2011. 17(6): 862-7.

[51] McDonald DJ, Fitzgerald RH Jr, Ilstrup DM. Two-stage reconstruction of a total hip arthroplasty because of infection. J Bone Joint Surg Am. 1989. 71(6): 828-34.

[52] Garcia-Oltra E, Garcia-Ramiro S, Martinez JC, et al. [Prosthetic joint infection by Candida spp.]. Rev Esp Quimioter. 2011. 24(1): 37-41.

[53] Uppuluri P, Srinivasan A, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot JL. Effects of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin on Candida albicans biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. Antimicrob Agents Chemother. 2011. 55(7): 3591-3.

82

# 攻读学位期间取得的研究成果

1. Zhai H; Pan J; Pang E; Bai BLavage with allicin in combination with vancomycin inhibits biofilm formation by Staphylococcus epidermidis in a rabbit model of prosthetic joint infection. PloS one. 2014. 9(7):

E102760. IF: 3.5

2. 翟浩瀚陈艺 龙浩 陈玉书 潘建超 白波，经皮椎弓根穿刺辅助定位导向装置在经皮椎体成形术中的应用，中国骨科临床与基础研究杂志，2014.4

3. 翟浩瀚陈艺龙浩陈玉书潘建超白波，经皮椎弓根穿刺辅助装置开发和应用的可行性，广州医科大学学报，2014.42（5），88-91

83

致 **谢**

“逝者如斯夫，不舍昼夜”，三年的博士学习生涯即将结束。这三年时光只是我人生的一小部分，但它如一道流星，是我人生最闪亮的部分。这一过程如同去攀登高ft，要有坚强的意志和百折不挠的精神，又如去探求迷宫，需要冷静的判断和果敢的选择。

三年的攻读博士学位是我人生所遇到的最大挑战，但是我不是一个人在战斗，因为我有一个好的引路人，这就是我的导师白波教授，在他的谆谆教诲与悉心指导使我能够顺利完成学业，导师渊博的学识、严谨的科研作风和和蔼待人的态度是我学习的榜样，您的支持和信任是我完成学业和课题的保证。

衷心感谢骨科研究所的陈艺老师、张姝江博士对我在科研过程中的帮助，广州医科大学第一附属医院骨科卢伟杰主任、林志雄主任、黎文主任、陈东峰副主任、刘琦医生悉心的临床指导。感谢2012级骨科博士研究生陈玉书和硕士

研究生潘建超、陈沼飞帮助，感谢2013级全体骨科博士和硕士研究生的帮助。感谢我的妻子和儿子，感谢白发苍苍的父母，他们的支持和理解使我顺利

完成学业。

尽管学业即将结束，但以后的路还长，唯有将感激之情深藏于心，更加努力的学习和工作。

2015年春于广州

翟浩瀚

84

# 学位论文独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

# 学位论文知识产权权属声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医科大学及附属单位。广州医科大学及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医科大学及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

# 学位论文使用授权声明

1、学校可以保留本论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。送交学位论文时间选择（请在下面相应栏内打“√”）：

①答辩后即可送：是否

②延迟一年后送：

③延迟二年后送：

④延迟三年后送：

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

85