

新型季铵盐纳米颗粒对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜抑制作用的研究

黄书满¹ 赵玉林¹ 董栋¹ 张亚倩¹ 耿静¹

[摘要] 目的:探讨低浓度氯化十六烷基吡啶(CPC)季铵盐纳米颗粒在体外对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用。方法:建立金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和铜绿假单胞菌 ATCC15692 体外生物膜模型。制备低浓度(0.010%、0.025%和 0.050%)CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液。用 alamarBlue 法分别在 CPC 作用 5 min 和 2 h 后检测金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离及其生物膜的活性。应用激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察 CPC-季铵盐纳米颗粒与金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜之间的相互作用。结果:低浓度(0.010%、0.025%和 0.050%)CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液对游离金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均有显著的抗菌作用($P<0.05$),对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜分别作用 5 min 和 2 h 后同样具有显著的抗菌效果($P<0.05$)。在 CLSM 研究中,金黄色葡萄球菌生物膜的面积明显减小,铜绿假单胞菌生物膜中的死菌明显增加。结论:低浓度的 CPC-季铵盐纳米颗粒即可对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌及生物膜产生显著的杀伤作用,有望应用于慢性鼻窦炎的治疗。

[关键词] 季铵盐纳米颗粒;金黄色葡萄球菌;铜绿假单胞菌;细菌生物膜

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2019.04.010

[中图分类号] R765 **[文献标志码]** A

A novel nanoparticle in treatment of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilms

HUANG Shuman ZHAO Yulin DONG Dong ZHANG Yaqian GENG Jing

(Department of Rhinology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052, China)

Corresponding author: ZHAO Yulin, E-mail: zhaoyulinmail@163.com

Abstract Objective: To investigate CPC-nanoparticles of low concentrations in treatment of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilms in vitro. **Method:** We established specific biofilms of staphylococcus aureus ATCC 25923 and pseudomonas aeruginosa ATCC 15692, and prepared CPC-nanoparticles and CPC micelle solutions of low concentrations (0.010%, 0.025% and 0.050%). AlamarBlue was used to test the viability of both planktonic staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa and their biofilms after treatment for 5 minutes and 2 hours respectively in the bactericidal efficacy study. The interaction between CPC-nanoparticles and staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilms was observed by confocal laser scanning microscope (CLSM). **Result:** 0.010%, 0.025% and 0.050% CPC-nanoparticles and CPC micelle solutions had significant bactericidal effect on planktonic staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa after five-minute exposure ($P<0.05$), and staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilms after both five-minute and two-hour treatments ($P<0.05$). In CLSM study, the size of staphylococcus aureus biofilms decreased, while dead bacteria of pseudomonas aeruginosa biofilms increased after two-hour treatment. **Conclusion:** CPC-nanoparticles had significant bactericidal effects on staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilms, which could be used in treatment of CRS.

Key words nanoparticle; staphylococcus aureus; pseudomonas aeruginosa; bacterial biofilm

慢性鼻窦炎(chronic rhinosinusitis, CRS)是耳鼻咽喉头颈外科的常见病,是鼻腔鼻窦黏膜的慢性炎症性疾病,致病菌感染是其重要因素之一。金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌是 CRS 的主要致病菌,分别占检出细菌的 61%和 8%^[1-2]。细菌生物膜是不同于游离菌的另一种细菌存在形式。据估计,约 65%的人类慢性细菌性感染与生物膜有关。金黄

色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜影响 CRS 患者的手术效果^[3-4],与 CRS 患者的生活质量下降、黏膜炎症加重、骨炎形成、炎症复发等密切相关^[5-6]。氯化十六烷基吡啶(cetylpyridinium chloride, CPC)季铵盐纳米颗粒是一种大单层囊泡(large unilamellar vesicles, LUV)纳米颗粒^[7-8],可以通过 CPC 和胆固醇等摩尔混合产生^[8]。CPC 的抗微生物活性早已被认识,在临床实践和日常生活中广泛应用于皮肤和黏膜的消毒剂及局部防腐剂^[9-10]。

¹ 郑州大学第一附属医院鼻科(郑州, 450052)

通信作者:赵玉林, E-mail: zhaoyulinmail@163.com

先前的研究显示,CPC-季铵盐纳米颗粒从最低浓度0.05%开始,作用10 min后可杀灭超过99%的金黄色葡萄球菌生物膜,显示出剂量依赖性抗生物膜效应。另据报道,即使在非常低的浓度下,CPC仍然可以杀死游离大肠杆菌(0.025% CPC)、金黄色葡萄球菌(0.003% CPC)和铜绿假单胞菌(0.5% CPC)^[11-12]。目前,低浓度CPC-季铵盐纳米颗粒对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用笔者尚未见报道。为此,我们进行了低浓度CPC-季铵盐纳米颗粒体外对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜抑制作用的实验研究。

1 材料与方法

1.1 CPC-季铵盐纳米颗粒和胶体溶液的制备

参考文献方法制备CPC-季铵盐纳米颗粒^[13]。简要步骤如下:准确称量等量的CPC和胆固醇,加入10 ml超纯水,将混合物在冰浴中超声处理20 min(30/10s 开关周期,40%幅度),然后室温下磁力搅拌板(400 r/min)上搅拌过夜,蒸发掉溶剂即可制备季铵盐纳米颗粒^[14]。将与上述等量的CPC溶解在10 ml超纯水中,室温下搅拌过夜蒸发掉溶剂即可制备胶体溶液。

1.2 细菌菌株和生物膜模型的构建

解冻金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和铜绿假单胞菌 ATCC15692 菌株,37℃琼脂平板上培养24 h以复苏菌株。挑取单菌落转移至含有5 ml营养肉汤培养液的50 ml离心管中,37℃培养箱中200 r/min温育24 h。营养肉汤培养液稀释所得细菌悬液,使其在600 nm波长下的吸收度(A_{600})为0.05。转移10 ml细菌悬液到50 ml离心管中,37℃培养箱中200 r/min温育,每小时测量 A_{600} 制备细菌的标准生长曲线。选择对数生长期的细菌作为实验对象。

在96孔微量培养板中,每孔加入150 μ l稀释后的金黄色葡萄球菌 ATCC25923 或铜绿假单胞菌 ATCC15692 悬液,阴性对照孔加入150 μ l CSF肉汤培养液(不含细菌)。然后70 r/min旋转振荡器上37℃温育48 h即可形成相应的金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌生物膜。

激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)研究中的生物膜需在8孔培养玻片中建立。对于金黄色葡萄球菌生物膜,向每个孔中加入300 μ l细菌悬浮液,37℃下旋转振荡器上70 r/min温育24 h,然后加入新鲜CSF肉汤培养液以维持细菌活力,并在37℃ 5% CO₂ 和90%湿度下再孵育48 h。对于铜绿假单胞菌生物膜,每孔加入150 μ l细菌悬液,然后将培养玻片调至与水平面成45°角培养,即可在气-液界面形成生物膜。

1.3 抗游离细菌活性研究

转移1 ml上述游离细菌溶液到2 ml离心管

中,室温下1 020 g离心10 min,弃上清。加入1 ml CPC-季铵盐纳米颗粒,反复吹打混匀。37℃培养箱中200 r/min分别温育5 min和2 h,转移0.5 ml处理过的细菌溶液到2 ml离心管中,如上所述离心,然后加入1 ml盐水,重复上述洗涤(即离心-再悬浮)过程一次。

将上述处理后的细菌溶液用盐水1:5稀释,向黑色96孔培养板每孔加入100 μ l稀释液,然后再向每个孔中加入100 μ l CSF肉汤培养液和20 μ l alamarBlue试剂,使试剂和细菌液体量为1:10。37℃下旋转平板避光温育1 h,通过酶标仪测定样品的荧光强度。生理盐水作阴性对照,生理盐水1:1稀释 alamarBlue 试剂作为背景,整个实验过程重复3次。所得样品的荧光强度减去背景荧光强度,与对照组荧光强度的比率为相对活性。

1.4 抗生物膜活性研究

将上述所建立的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜洗涤2次,除去游离细菌^[15-16],然后用CPC-季铵盐纳米颗粒和CPC胶体溶液分别在37℃下作用5 min和2 h。用盐水洗涤2次生物膜,加入150 μ l CSF肉汤培养液孵育24 h以恢复生物膜活力,然后再用盐水洗涤2次生物膜。旋转平板上37℃避光孵育1 h,向每个孔中加入200 μ l alamarBlue溶液(10% AB在CSF中)。最后,用酶标仪(520~540 nm 激发光和580~600 nm 发射光)测量样品的荧光强度。生理盐水作阴性对照, alamarBlue 试剂作背景。样品荧光强度减去背景荧光强度,计算生物膜的活性。所有样品一式4份,实验重复3次。

1.5 CPC-季铵盐纳米颗粒与生物膜相互作用机制的CLSM研究

制备含有0.25% 1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶高氯酸盐(DiI)的CPC-季铵盐纳米颗粒溶液。生理盐水冲洗2次培养玻片上的生物膜,除去游离菌,每孔加入300 μ l DiI溶液,分别温育5 min和2 h。再洗涤2次,用300 μ l 5%戊二醛在室温下固定30 min。然后将样品用300 μ l的5 μ m SYTO-9溶液染色,室温下避光温育15 min以标记活细胞。每孔中加入300 μ l的5 μ m SYTOX溶液标记死细胞。上述每步中,用300 μ l盐水冲洗2次洗掉上一步骤中的残余物。对于金黄色葡萄球菌生物膜,用Leica TCS SP563×/1.2物镜和0.5 μ m激光扫描。激发波长561 nm/476 nm/504 nm和发射波长570~600 nm/500~520 nm/520~540 nm分别检测DiI、SYTO-9和SYTOX的荧光。铜绿假单胞菌生物膜研究使用Zeiss LSM700 CLSM 63×/1.4物镜和0.5 μ m激光扫描,DiI、SYTO-9和SYTOX激发/发射波长分别为555 nm/570 nm,488 nm/520 nm,405 nm/480 nm。每个实验重复2次。ZEN(ZEISS 2012)

和 ImageJ 1.43 进行图像处理和分析。

1.6 统计学分析

按照数据类型选择方差分析或 Kruskal-Wallis 检验进行多组间比较,以 Mann-Whitney *U* 检验进一步比较 2 组之间有无差异。统计学软件为 SPSS 19.0 和 Graphpad Prism 5.0。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗游离细菌的作用

0.010%、0.025% 和 0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌均有显著的抗菌作用($P < 0.05$)。作用 5 min 后,不同浓度的 CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液(0.010%、0.025% 和 0.050%)可抑制 98% 以上的游离金黄色葡萄球菌,0.010% 和 0.025% CPC-季铵盐纳米颗粒具有比 CPC 胶体溶液更好的抗菌效果,而 0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液之间抗菌效果差异无统计学意义。0.010%、0.025% 和 0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液可抑制 53.51%~93.66% 的游离铜绿假单胞菌,0.010% 和 0.025% CPC-季铵盐纳米颗粒的抗菌效果较同等浓度的胶体溶液差,0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒的抗菌效果优于其相同浓度的 CPC 胶体溶液($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

2.2 抗生物膜效应

0.010%、0.025% 和 0.050% 的 CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜都具有显著的抗菌效果($P < 0.05$)。见图 2 和表 2~4。

作用 5 min 后,不同浓度(0.010%、0.025% 和 0.050%)的 CPC 胶体溶液抑制 69.31%~80.26% 的金黄色葡萄球菌生物膜,CPC-季铵盐纳米颗粒抑制 53.90%~70.55% 的金黄色葡萄球菌生物膜。作用 2 h 后,CPC-季铵盐纳米颗粒抑制 91.07% 以上的金黄色葡萄球菌生物膜,CPC 胶体溶液可抑制 84.87%~86.68%。除 0.025% 的 CPC 胶体溶液外,随着作用时间的增加,所有组(CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液)对金黄色葡萄球菌生物膜的抗菌效果显著增加(表 2~4 和图 2)。

作用 5 min 后,CPC 胶体溶液抑制 41.59%~45.77% 的铜绿假单胞菌生物膜,CPC-季铵盐纳米颗粒为 28.25%~43.37%。作用 2 h 后,CPC 胶体溶液抑制超过 82% 的铜绿假单胞菌生物膜,CPC-季铵盐纳米颗粒抑制 42.88%~51.56% 的生物膜。所有组(CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液)中铜绿假单胞菌生物膜的存活率随着作用时间的增加差异有统计学意义(图 2 和表 2~4)。

2.3 CPC-季铵盐纳米颗粒与生物膜作用机制的 CLSM 研究结果

CLSM 图像中 CPC-季铵盐纳米颗粒、活细菌和死细菌分别呈红色、绿色和蓝色。CPC-季铵盐纳米颗粒处理后金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜的厚度均减少,且作用 2 h 比 5 min 明显减少。对于金黄色葡萄球菌生物膜,CPC-季铵盐纳米颗粒在 5 min 内几乎全部进入整个金黄色葡萄球菌生物膜,并且处理 2 h 后生物膜的面积显著减少。对于铜绿假单胞菌生物膜,生物膜减小的范围不如金黄色葡萄球菌生物膜明显,但 CPC-季铵盐纳米颗粒作用 2 h 后蓝色荧光明显增加,绿色荧光几乎消失,表明死细菌明显增多。见图 3、4。

3 讨论

细菌生物膜是不同于游离菌的另一种细菌存在形式,由细胞外保护性基质和包裹其中的细菌群落组成,是具有一定空间构型的高度组织化的结构。生物膜形成后,细菌对宿主免疫及抗生素类药物的抵抗较游离菌大大增强。细菌生物膜在 CRS 患者鼻腔鼻窦黏膜表面的检出率为 30%~80%^[17-18],可能是加重 CRS 病情的重要因素。目前认为金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜形成与 CRS 重症化和难治化之间存在相关性。本研究探讨了低浓度(0.010%、0.025% 和 0.050%)CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液对 CRS 中 2 种重要病原体金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的游离菌和生物膜 2 种存在形式的抗菌作用。所有季铵盐纳米颗粒中的 CPC 含量与相应的胶体溶液一致。本研究中,低浓度 CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的游离和生物膜 2 种存在形式均具有显著的抗菌作用,这与我们之前的研究结果一致^[2,15]。

表 1 作用 5 min 后金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的相对活性

	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌		
	相对活性	抑制率/%	<i>P</i>	相对活性	抑制率/%	<i>P</i>
0.010% CPC	0.0130	98.70	0.002	0.2330	79.83	0.004
0.010% NP	0.0095	99.04		0.5372	53.51	
0.025% CPC	0.0131	98.69	0.003	0.1257	89.12	0.029
0.025% NP	0.0108	98.92		0.1654	85.69	
0.050% CPC	0.0098	99.02	0.187	0.1045	90.96	0.046
0.050% NP	0.0162	98.38		0.0732	93.66	

注:CPC 为 CPC 胶体溶液,NP 为 CPC-季铵盐纳米颗粒。

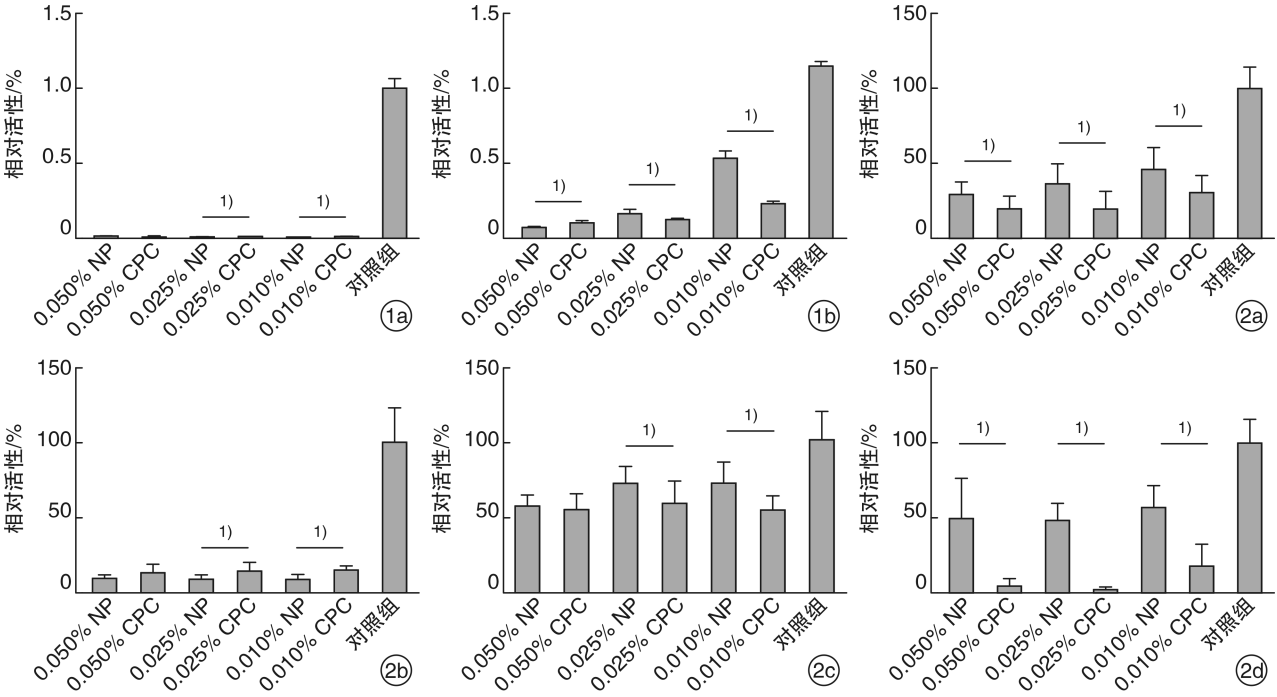


图 1 不同低浓度 CPC 作用 5 min 后金黄色葡萄球菌(1a)和铜绿假单胞菌(1b)游离菌相对活性 ¹⁾ $P < 0.05$; 图 2 不同低浓度 CPC 分别作用 5 min 和 2 h 后金黄色葡萄球菌(2a,2b)和铜绿假单胞菌(2c,2d)生物膜的相对活性 ¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 作用 5 min 后金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜的相对活性

	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌		
	相对活性	抑制率/%	<i>P</i>	相对活性	抑制率/%	<i>P</i>
0.010% CPC	0.306 9	69.31	0.009	0.542 3	45.77	0.001
0.010% NP	0.461 0	53.90		0.717 5	28.25	
0.025% CPC	0.197 4	80.26	0.004	0.584 1	41.59	0.020
0.025% NP	0.363 8	63.62		0.716 0	28.40	
0.050% CPC	0.197 6	80.24	0.010	0.544 3	45.57	0.552
0.050% NP	0.294 5	70.55		0.566 3	43.37	

表 3 作用 2 h 后金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜的相对活性

	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌		
	相对活性	抑制率/%	<i>P</i>	相对活性	抑制率/%	<i>P</i>
0.010% CPC	0.151 3	84.87	0.000	0.180 0	82.00	0.000
0.010% NP	0.089 3	91.07		0.571 2	42.88	
0.025% CPC	0.144 8	85.52	0.009	0.022 4	97.76	0.000
0.025% NP	0.090 7	90.93		0.484 4	51.56	
0.050% CPC	0.133 2	86.68	0.053	0.045 1	95.49	0.000
0.050% NP	0.096 7	90.33		0.497 4	50.26	

表 4 分别作用 5 min 和 2 h 后金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物膜的相对活性 $\bar{x} \pm s$

	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌		
	5 min	2 h	<i>P</i>	5 min	2 h	<i>P</i>
0.010% CPC	30.688 6±11.379 9	15.125 3±2.766 1	0.000	54.227 0±9.180 6	17.989 6±14.540 4	0.000
0.010% NP	46.097 8±14.635 9	8.925 4±3.363 0	0.000	71.747 1±13.647 5	57.122 2±14.531 5	0.019
0.025% CPC	19.743 9±11.703 4	14.477 7±5.779 1	0.176	58.410 0±14.593 1	4.506 1±5.201 1	0.000
0.025% NP	36.382 2±13.444 4	9.065 5±3.034 2	0.000	71.603 7±10.923 0	49.736 4±26.818 1	0.016
0.050% CPC	19.762 5±8.509 6	13.321 0±5.723 4	0.041	54.427 7±10.331 9	2.242 1±1.881 2	0.000
0.050% NP	29.452 7±8.212 9	9.666 9±2.374 3	0.000	56.633 5±7.290 6	48.439 5±11.354 1	0.047

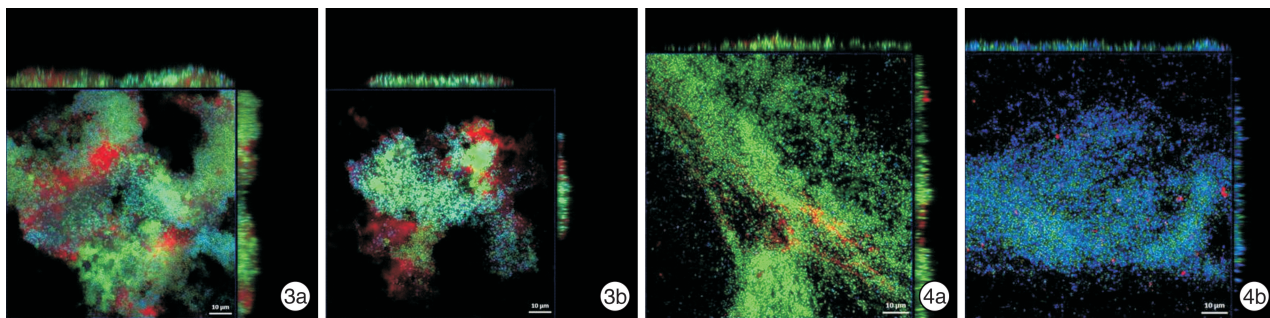


图 3 0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒分别作用 5 min(3a)和 2 h(3b)后金黄色葡萄球菌生物膜 CLSM 图像 红色:季铵盐纳米颗粒;绿色:活菌;蓝色:死菌。中间大图代表 Z-轴中心层的 X-Y 轴视图,顶部条形图表示 Y-轴中心层的 X-Z 轴视图,右侧的垂直条形图表示 X-轴中心层的 Y-Z 轴视图; 图 4 0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒分别作用 5 min(4a)和 2 h(4b)后铜绿假单胞菌生物膜 CLSM 图像 红色:季铵盐纳米颗粒;绿色:活菌;蓝色:死菌。中间大图代表 Z-轴中心层的 X-Y 轴视图,顶部条形图表示 Y-轴中心层的 X-Z 轴视图,右侧的垂直条形图表示 X-轴中心层的 Y-Z 轴视图。

对于金黄色葡萄球菌游离菌,0.010%和0.025% CPC-季铵盐纳米颗粒的抗菌效果优于相同浓度的 CPC 胶体溶液,而 0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒与胶体溶液具有相同的抗菌作用。虽然 0.010%和 0.025% CPC-季铵盐纳米颗粒对铜绿假单胞菌的抗菌效果比同等浓度的 CPC 胶体溶液差,但 0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒的效果优于对应的胶体溶液。表明季铵盐纳米颗粒对金黄色葡萄球菌的抗菌作用与剂量无关,而对铜绿假单胞菌的抗菌作用是剂量依赖性的。Majidpour 等^[19]报道金黄色葡萄球菌是常见的抗生素剂量依赖性的,这种差异可能是由于 CPC-季铵盐纳米颗粒不同于常见抗生素的特定抗菌机制。

作用 5 min 后,低浓度 CPC-季铵盐纳米颗粒对金黄色葡萄球菌生物膜的抗菌效果比 CPC 胶体溶液差,这与我们之前的研究结果一致^[15]。然而,作用 2 h 后,低浓度 CPC-季铵盐纳米颗粒与 CPC 胶体溶液几乎具有相同的抗菌效果,且与作用 5 min 相比具有更好的抗菌效果,表明 CPC-季铵盐纳米颗粒对金黄色葡萄球菌生物膜的抗菌效果是时间依赖性的。与作用 5 min 相比,除 0.025% CPC 胶体溶液组外,所有低浓度组作用 2 h 后对金黄色葡萄球菌生物膜具有显著的抗菌效果。可以得出结论,所有低浓度的 CPC 制剂随着时间的推移具有更好的抗金黄色葡萄球菌生物膜效果。在 CLSM 研究中,0.050% CPC-季铵盐纳米颗粒在作用 5 min 后即可渗透到金黄色葡萄球菌生物膜的全层,提示 CPC-季铵盐纳米颗粒可以作为其他药物的载体,在鼻腔冲洗过程中进入生物膜内部,帮助其他药物进一步发挥作用。并且作用 2 h 后生物膜的面积明显减少,提示纳米颗粒的 CPC 是缓释的,即 CPC-季铵盐纳米颗粒可以黏附于生物膜表面或内部,缓慢释放出 CPC,起到持续杀菌作用。

CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液在作用 5 min 后均显示出对铜绿假单胞菌生物膜较低的

抗菌效果。然而,CPC 胶体溶液在作用 2 h 后抑制超过 82% 的铜绿假单胞菌生物膜,对于铜绿假单胞菌生物膜的效力明显高于 CPC-季铵盐纳米颗粒。表明 CPC-季铵盐纳米颗粒对铜绿假单胞菌生物膜的抗菌效果并没有随着暴露时间的延长而增加,而 CPC 胶体溶液对铜绿假单胞菌的抗菌效果明显增加。但是,CLSM 研究显示,尽管铜绿假单胞菌生物膜面积的减小没有金黄色葡萄球菌生物膜那么明显,但 CPC-季铵盐纳米颗粒作用铜绿假单胞菌生物膜 2 h 后蓝色荧光明显增加,绿色荧光几乎消失,死细菌明显增加,表明不同细菌生物膜具有不同特性,导致 CPC-季铵盐纳米颗粒发挥作用的方式不同,推测因为铜绿假单胞菌生物膜是黏液状,CPC-季铵盐纳米颗粒作用后不易解离、分散、断裂,具体机制有待进一步研究。

本研究中,CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液与铜绿假单胞菌生物膜的相互作用机制与 Gilbert 等^[10]研究的变形链球菌(变形链球菌)生物膜相似,CPC 胶体溶液显示出比 CPC-季铵盐纳米颗粒更强的抗生物膜效果。相比之下,低浓度 CPC-季铵盐纳米颗粒和 CPC 胶体溶液与金黄色葡萄球菌生物膜作用 2 h 后的抗生物膜功效相似。研究表明 CPC 的抗菌作用主要是它们插入细胞膜导致细胞渗漏并最终导致细胞死亡^[11]。季铵盐纳米颗粒与铜绿假单胞菌生物膜和变形链球菌生物膜相互作用时,可能由于其体积较大,产生较大的空间位阻,进而阻碍了 CPC 对生物膜细胞的渗透,类似于之前已报道过的较大溶质分子和纳米颗粒^[20-21],而季铵盐纳米颗粒的粒径没有影响 CPC 对金黄色葡萄球菌生物膜细胞的渗透。Bereswill 等^[22]报道变形链球菌和金黄色葡萄球菌生物膜 CPC 的最小抑制浓度相同。表明生物膜的结构和内部超微结构而非细菌的种类对 CPC 抗菌机制起主要作用^[23]。

季铵盐纳米颗粒作为纳米载体具有很大的潜

力,可用于递送亲水性和亲脂性药物。本研究为时间依赖性的低浓度 CPC-季铵盐纳米颗粒抗生物膜研究提供了研究方向。众所周知,体内生物膜具有一些与体外不同的结构和组分特征^[24-25],这些差异是否会改变它们与季铵盐纳米颗粒的作用方式仍然未知^[26]。有待进一步的研究评估生长在鼻黏膜上的多细菌生物膜的行为方式是否与体外实验相似。

参考文献

- [1] BOASE S, FOREMAN A, CLELAND E, et al. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 210.
- [2] DONG D, THOMAS N, THIERRY B, et al. Distribution and inhibition of liposomes on staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilm[J]. PLoS One, 2015, 10: e0131806.
- [3] SINGHAL D, FOREMAN A, JERVIS-BARDY J, et al. staphylococcus aureus biofilms: nemesis of endoscopic sinus surgery[J]. Laryngoscope, 2011, 121: 1578—1583.
- [4] BENDOUAH Z, BARBEAU J, HAMAD W A, et al. Biofilm formation by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polypsis[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2006, 134: 991—996.
- [5] BESSA L J, EATON P, DEMATEI A, et al. Synergistic and antibiofilm properties of ocellatin peptides against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa[J]. Future Microbiol, 2018, 13: 151—163.
- [6] ZIMLICHMAN E, HENDERSON D, TAMIR O, et al. Health Care-Associated Infections: A Meta-Analysis of Costs and Financial Impact on the US Health Care System[J]. JAMA Int Med, 2013, 173: 2039—2046.
- [7] FERRER-TASIES L, MORENO-CALVO E, CANO-SARABIA M, et al. Quatsomes: vesicles formed by self-assembly of sterols and quaternary ammonium surfactants[J]. Langmuir, 2013, 29: 6519—6528.
- [8] COTTENYE N, CUI Z K, WILKINSON K J, et al. Interactions between non-phospholipid liposomes containing cetylpyridinium chloride and biofilms of Streptococcus mutans: modulation of the adhesion and of the bio-distribution[J]. Biofouling, 2013, 29: 817—827.
- [9] MCDONNELL G, RUSSELL A D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 1999, 12: 147—179.
- [10] GILBERT P, MOORE L E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet[J]. J Appl Microbiol, 2005, 99: 703—715.
- [11] SOUMET C, FOURREAU E, LEGRANDOIS P, et al. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in Escherichia coli[J]. Vet Microbiol, 2012, 158: 147—152.
- [12] FROMM-DORNIEDEN C, REMBE J D, SCHÄFER N, et al. Cetylpyridinium chloride and miramistin as antiseptic substances in chronic wound management: prospects and limitations[J]. J Med Microbiol, 2015, 64: 407—414.
- [13] THOMAS N, DONG D, RICHTER K, et al. Quatsomes for the treatment of Staphylococcus aureus biofilm[J]. J Materials Chemistry B, 2014, 11: 001953.
- [14] CUI Z K, BOUISSE A, COTTENYE N, et al. Formation of pH-sensitive cationic liposomes from a binary mixture of monoalkylated primary amine and cholesterol[J]. Langmuir, 2012, 28: 13668—13674.
- [15] AHMED K, GRIBBON P N, JONES M N. The application of confocal microscopy to the study of liposome adsorption onto bacterial biofilms[J]. J Liposome Res, 2002, 12: 285—300.
- [16] PEETERS E, NELIS H J, COENYE T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates[J]. J Microbiol Methods, 2008, 72: 157—165.
- [17] AL-MUTAIRI D, KILTY S J. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2011, 11: 18—23.
- [18] FOREMAN A, BOASE S, PSALTIS A, et al. Role of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2012, 12: 127—135.
- [19] MAJIDPOUR A, FATHIZADEH S, AFSHAR M, et al. Dose-dependent effects of common antibiotics used to treat staphylococcus aureus on biofilm formation[J]. Iran J Pathol, 2017, 12: 362—370.
- [20] MARCOTTE L, THERIEN-AUBIN H, SANDT C, et al. Solute size effects on the diffusion in biofilms of Streptococcus mutans[J]. Biofouling, 2004, 20: 189—201.
- [21] GUIOT E, GEORGES P, BRUN A, et al. Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two-photon excitation[J]. Photochem Photobiol, 2002, 75: 570—578.
- [22] BERESWILL S, VEY T, KIST M. Susceptibility in vitro of Helicobacter pylori to cetylpyridinium chloride[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999, 24: 189—192.
- [23] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8: 623—633.
- [24] FLEMMING H C, NEU T R, WOZNIAK D J. The EPS matrix: the "house of biofilm cells"[J]. J Bacteriol, 2007, 189: 7945—7947.
- [25] BJARNSHOLT T, ALHEDE M, ALHEDE M, et al. The in vivo biofilm[J]. Trends Microbiol, 2013, 21: 466—474.
- [26] THET N T, WALLACE L, WIBAUX A, et al. Development of a mixed-species biofilm model and its virulence implications in device related infections[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018, [Epub ahead of print]