

• 综 述 •

## 慢性创面细菌生物膜形成与治疗研究进展\*

李晨希 综述, 宗建春<sup>△</sup>审校

(重庆医科大学附属第二医院急救部, 重庆 400010)

**[摘要]** 细菌感染已成为慢性创面难以愈合的重要因素, 随之形成的细菌生物膜会进一步增加治疗难度, 因此急需寻找新的、有效的治疗手段。生物膜的有效清除是临床治疗慢性创面的关键, 细菌“劫持”理论为了解创面生物膜提供了新的视角, 部分新兴材料也展现了良好的应用前景。该文综述了慢性创面细菌生物膜形成机制的新进展及基于部分新兴材料的新抗生物膜疗法, 旨在为规范治疗慢性创面感染提供新思路。

**[关键词]** 慢性创面; 生物膜; 纳米技术; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2023.13.019 中图分类号: R641

文章编号: 1009-5519(2023)13-2259-04 文献标识码: A

### Research progress in bacterial biofilm formation and treatment of chronic wound\*

LI Chenxi, ZONG Jianchun<sup>△</sup>

(Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** Bacterial infection has become an important factor that makes chronic wound difficult to heal, and the resulting bacterial biofilm will further increase the difficulty of treatment. Therefore, it is urgent to find new and effective treatment methods. The effective removal of biofilms is the key to clinical treatment of chronic wound. The theory of bacterial "hijacking" provides a new perspective for understanding wound biofilms, and some emerging materials also show good application prospects. The article reviews the new progress in the formation mechanism of bacterial biofilm in chronic wound and new anti biofilm therapies based on some emerging materials, aiming to provide new ideas for the standardized treatment of chronic wound infection.

**[Key words]** Chronic wounds; Biofilm; Nanotechnology; Review

慢性创面是指创面愈合阶段失败、创面存在生物膜迹象或规范治疗 4 周以上未愈、无愈合倾向的创面<sup>[1-3]</sup>。近年来, 慢性创面发病率居高不下, 严重加重家庭、社会经济负担, 并降低患者生活质量。在影响创面慢性化的众多因素中, 细菌感染已成为主要因素, 且常以生物膜的形式出现<sup>[4]</sup>。细菌可通过分泌胞外多糖、蛋白质、细胞外 DNA (eDNA) 等胞外基质 (EPS) 将自身菌体包裹, 形成生物膜<sup>[5-6]</sup>。与浮游细菌相比, EPS 能够显著提高膜内细菌对各种杀/抑菌剂的耐受性, 同时增加对宿主免疫系统的抵抗力, 使得对生物膜感染的慢性创面的治疗复杂化<sup>[7]</sup>。因此, 生物膜的有效清除是临床治疗慢性创面的关键。目前, 对于创面生物膜的研究层出不穷, 本文就新的创面生

物膜理论和部分新兴材料上 (纳米材料和超声微泡) 的抗生物膜疗法进行了综述, 这对临床认识创面细菌生物膜感染和治疗具有十分重要的意义。

### 1 细菌“劫持”理论

既往对生物膜形成的研究多侧重于生物膜本身, 而忽略了与宿主因子的关系。在生物膜引发的慢性感染中, 宿主成分如 DNA、透明质酸、胶原蛋白、纤维连接蛋白、f-肌动蛋白、血浆可通过不同机制被纳入 EPS 中, 并在生物膜形成的不同阶段发挥重要作用<sup>[8]</sup>, 研究者将其称为细菌“劫持”理论。

**1.1 外源性 eDNA** CHIANG 等<sup>[9]</sup> 发现将外源性 eDNA 加入已培养 2 d 的铜绿假单胞菌生物膜内, 继续培养 2 d 后, 超敏共聚焦激光显微镜下可见整个生

\* 基金项目: 重庆市科卫联合面上项目 (2021MSXM267)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: zongjianchuncq@163.com。

物膜中都均匀分布有高水平 eDNA, 而对照组内则仅显示了微菌落内部的高水平 eDNA 区域, 提示外源性 eDNA 能被纳入铜绿假单胞菌生物膜中, 并在物理上参与 EPS 的组成。ALHEDE 等<sup>[10]</sup> 通过研究进一步证实了慢性炎症反应中 eDNA 的来源主要是宿主多形核白细胞。但研究在小鼠植入物感染模型中观察到宿主来源的 eDNA 没有被整合到生物膜中, 反而聚集在生物膜周围, 并构成了一个次级基质, 其原因可能是多形核白细胞的坏死抑制了 eDNA 的释放, 或只是生物膜内 eDNA 更难以检测。

**1.2 透明质酸和胶原蛋白** 透明质酸和胶原蛋白是存在于宿主皮肤中的蛋白质。BIRKENHAUER 等<sup>[11]</sup> 研究发现, 在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌感染的慢性创面中, 透明质酸和(或)胶原蛋白可充当细菌附着的配体并促进生物膜产量增加。RAHMAN 等<sup>[12]</sup> 进一步研究发现, 创面床中胶原蛋白与生物膜的结合是通过“物理纠缠”成为 EPS 的组分来实现的, 当胶原蛋白并入 EPS 后, 生物膜黏弹性显著增加, 且与胶原蛋白水平呈正相关。

**1.3 f-肌动蛋白** 宿主炎症细胞释放的聚电解质如 f-肌动蛋白、神经丝、波形蛋白可触发浮游细菌的遗传变化, 从而启动生物膜的形成。f-肌动蛋白被证明是细菌生物膜的结构支撑<sup>[13]</sup>。BUCKI 等<sup>[14]</sup> 观察到铜绿假单胞菌在生长过程中不仅能与 f-肌动蛋白网络结合优先附着在细胞骨架上, 且在 f-肌动蛋白的存在下, 其群集活性显著增加。

**1.4 血浆** 血浆对生物膜形成的贡献目前主要集中在对表皮葡萄球菌模型的研究。传统观点认为, 表皮葡萄球菌生物膜的产生主要是由细菌分泌的多糖细胞间黏附素和基质结合蛋白所介导。有研究显示, 宿主血浆存在时可消除表皮葡萄球菌生物膜形成过程对这 2 种基质成分的需求, 可能是因为血浆中人细胞外基质结合蛋白质(如纤维蛋白原、纤维连接蛋白、玻璃蛋白、弹性蛋白和胶原蛋白)与表皮葡萄球菌产生的黏附蛋白相互作用, 其中一些蛋白质可充当多糖细胞间黏附素, 从而促进聚集运动, 但具体是哪一种或几种蛋白尚未可知<sup>[15-16]</sup>。

## 2 抗生物膜法

目前, 创面生物膜感染的治疗仍以机械清创联合抗生素、局部敷料为主, 但存在较多不足。如机械清创会对健康组织造成新损伤, 并可能诱导细菌入血, 导致继发感染; 抗生素与局部敷料的应用也收效甚微。因此一些新的治疗策略如纳米粒子和超声微泡不断涌现并展现出良好的应用前景。

**2.1 纳米粒子** 基于纳米粒子系统的策略最近被提出作为潜在的抗菌方法, 并用于治疗慢性创面生物膜感染。根据不同作用机制, 其可大致分为 3 类, 一是具有固有抗菌特性的无机纳米材料, 如金属或金属氧化物纳米粒子; 二是作为递药载体, 如脂质纳米制剂、生物聚合物纳米粒子、微针; 三是具有混合作用的双功能制剂, 如碳基材料。

**2.1.1 无机纳米材料** 以金属或金属氧化物纳米粒子为代表的无机纳米材料的抗菌作用主要通过 2 条途径实现: 一是通过释放的金属离子与膜内核酸和蛋白质的官能团(如氨基、巯基和羧基)相互作用, 进而破坏微生物的酶活性和细胞结构; 二是通过触发活性氧的产生, 磷脂氧化破坏细胞壁的完整性, 使内部核酸或蛋白质崩溃, 从而产生杀菌作用<sup>[17]</sup>。金属或金属氧化物纳米粒子包括银、铜、金、钛和锌等, 以银为基础的纳米颗粒备受关注。由于银纳米粒具有细胞毒性, 在创面感染中的应用受限。为克服这一缺陷, 研究者提出将高效超微的银纳米颗粒与生物相容性水凝胶相结合<sup>[18]</sup>。水凝胶的加入既能使银离子持续可控释放而没有毒性, 又能发挥其抗菌作用, 使其在细菌生物膜中不断累积, 并通过协调粒径相关途径使生物膜解体, 保证了生物膜的清除并促进创面愈合。

**2.1.2 递药载体** 脂质纳米制剂、聚合物纳米粒子(如壳聚糖、海藻酸、纤维素和透明质酸)、微针和磁铁矿具有良好的生物相容性, 在慢性创面生物膜感染中被广泛应用于传递抗菌药物的载体。LI 等<sup>[19]</sup> 报道了一种负载香芹酚作为抗菌剂的明胶纳米乳剂的制备, 在小鼠创面生物膜模型中, 纳米乳剂显示出对耐药细菌生物膜的广谱抗菌活性, 并可显著加快创面愈合。PERMANA 等<sup>[20]</sup> 首次将壳聚糖修饰后的微粒与溶解性微针结合作为载体系统选择性递送银纳米颗粒, 结果显示, 在大鼠离体皮肤生物膜模型中, 该系统可清除 100% 的细菌负荷。上述研究表明, 纳米载体有望用于细菌生物膜感染的慢性创面的前瞻性强化管理。

**2.1.3 双功能制剂** 碳基材料是一种新型纳米材料, 与金属纳米颗粒类似, 其固有抗菌机制是通过产生活性氧后发生氧化应激, 进而使细胞通透性增加<sup>[21-22]</sup>。另外, 由于碳基材料具有良好的水溶性和生物相容性, 可作为药物传输载体。目前, 碳基材料如石墨烯、富勒烯、碳纳米管、碳纳米纤维及其衍生物多与其他纳米材料联合制备成复合纳米制剂, 共同用于慢性创面的治疗。有研究显示, 多壁碳纳米管与羟基磷灰石、氧化锌、银纳米粒子所制备的纳米复合物具有显著的抗菌活性, 并能抑制多种相关微生物菌株

(如金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和白色念珠菌)的生物膜形成<sup>[23]</sup>。

**2.2 超声微泡技术** 微泡是由脂质、聚合物或蛋白质单层或其他表面活性剂材料包裹的微米大小气泡。暴露在超声下的微泡可作为空化核,降低超声空化的阈值,其在短时间内可显著增强超声的声孔效应,使生物膜的通透性增加,并进一步发挥游离抗生素的杀菌作用。如超声微泡联合万古霉素可增强万古霉素对表皮葡萄球菌的杀菌作用,并在生物膜内形成更多的微孔,使表皮葡萄球菌的成膜密度和活菌数显著降低<sup>[24]</sup>。微泡也可被某些抗生素修饰,在保留抗生素原有灭菌作用的同时,修饰后的微泡在超声诱导下对生物膜的破坏作用进一步增加,进而导致了更强的生物膜通透性。KOUIJZER 等<sup>[25]</sup>首次成功制备了万古霉素修饰的微泡,与对照微泡组相比,修饰后的微泡与生物膜结合的频率显著增加,超声辐照后,生物膜面积减少了 28%。另外,超声微泡还能携带生物活性气体一氧化氮促进生物膜扩散和杀灭细菌。一方面,振荡的微泡具有诱导机械破坏生物膜和促进抗生素渗透到生物膜的能力;另一方面,在微泡壳的保护下,一氧化氮的释放可在时间和空间上得到控制,克服了一氧化氮高反应性(半衰期短、扩散距离有限)所带来的传递困难问题。LUTHERYN 等<sup>[26]</sup>通过在人工创面培养基上建立体外铜绿假单胞菌生物膜模型,利用一氧化氮微泡(NOMBs)联合庆大霉素进行研究,结果显示,单独使用 NOMBs 可显著减少附着的生物膜(94.0%)和可培养的细菌(65.3%),而在 NOMBs 混悬液中加入亚抑菌庆大霉素后,生物膜与细菌细胞减少均达 99.9%。该研究首次证明了 NOMBs 在体外分散和增强抗生素对细菌生物膜的有效性。

### 3 小结与展望

细菌生物膜形成理论一直是众多学者致力攻关的难题,生物膜的有效清除也是临床上治疗慢性创面时长期面临的挑战。细菌“劫持”理论为了解创面生物膜提供了新的视角,部分新兴材料也展现了良好的应用前景,但该理论研究仍处于初级阶段。纳米材料和超声微泡技术在临床上的应用也任重道远,仍需要积极进行基础理论探索,并不断开发新的治疗策略。相信随着基础研究的不断深入,治疗慢性创面生物膜感染的新方法也会不断涌现。

### 参考文献

[1] 谭谦,徐晔.慢性创面治疗的理论和策略[J].中华烧伤杂志,2020,36(9):798-802.

- [2] HAESLER E, SWANSON T, OUSEY K, et al. Clinical indicators of wound infection and biofilm: Reaching international consensus [J]. J Wound Care, 2019, 28(Sup3b): s4-s12.
- [3] ZINDLE J K, WOLINSKY E, BOGIE K M. A review of animal models from 2015 to 2020 for preclinical chronic wounds relevant to human health[J]. J Tissue Viability, 2021, 30(3): 291-300.
- [4] KADAM S, NADKARNI S, LELE J, et al. Bio-engineered platforms for chronic wound infection studies: How can we make them more human-relevant? [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 418.
- [5] SRINIVASAN R, SANTHAKUMARI S, POONGUZHALI P, et al. Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 676458.
- [6] 李萌,马永生,李莹,等.噬菌体防控水产品中细菌生物膜污染的研究进展[J].水产科学,2021,40(3):467-474.
- [7] FANAEI PIRLAR R, EMANEINI M, BEIGVERDI R, et al. Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilms in the wound-like medium[J]. PLoS One, 2020, 15(6): e0235093.
- [8] MIRZAEI R, RANJBAR R. Hijacking host components for bacterial biofilm formation: An advanced mechanism [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 103: 108471.
- [9] CHIANG W C, NILSSON M, JENSEN P, et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in pseudomonas aeruginosa biofilms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(5): 2352-2361.
- [10] ALHEDE M, ALHEDE M, QVORTRUP K, et al. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections in vivo [J]. Pathog Dis, 2020, 78(2): 254.
- [11] BIRKENHAUER E, NEETHIRAJAN S, WEESE J S. Collagen and hyaluronan at wound sites

- influence early polymicrobial biofilm adhesive events[J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14:191.
- [12] RAHMAN M U, FLEMING D F, SINHA I, et al. Effect of collagen and EPS components on the viscoelasticity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Soft Matter*, 2021, 17(25): 6225-6237.
- [13] KÖSEOĞLU V K, AGAISSE H. Evolutionary perspectives on the moonlighting functions of bacterial factors that support actin-based motility[J]. *mBio*, 2019, 10(4): e01520.
- [14] BUCKI R, NIEMIROWICZ K, WNOROWSKA U, et al. Polyelectrolyte-mediated increase of biofilm mass formation [J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15:117.
- [15] SKOVDAL S M, HANSEN L K, IVARSEN D M, et al. Host factors abolish the need for polysaccharides and extracellular matrix-binding protein in *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation[J]. *J Med Microbiol*, 2021, 70(3): 1287.
- [16] OTTO M. *Staphylococcus epidermidis*: The accidental pathogen[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(8): 555-567.
- [17] MALLICK S, NAG M, LAHIRI D, et al. Engineered nanotechnology: An effective therapeutic platform for the chronic cutaneous wound [J]. *Nanomaterials(Basel)*, 2022, 12(5): 778.
- [18] HAIDARI H, BRIGHT R, GARG S, et al. Eradication of mature bacterial biofilms with concurrent improvement in chronic wound healing using silver nanoparticle hydrogel treatment [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(9): 1182.
- [19] LI C H, LANDIS R F, MAKABENTA J M, et al. Nanotherapeutics using all-natural materials. Effective treatment of wound biofilm infections using crosslinked nanoemulsions[J]. *Master Horiz*, 2021, 8(6): 1776-1782.
- [20] PERMANA A D, ANJANI Q K, SARTINI, et al. Selective delivery of silver nanoparticles for improved treatment of biofilm skin infection using bacteria-responsive microparticles loaded into dissolving microneedles[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 120: 111786.
- [21] HENNA T K, PRAMOD K. Graphene quantum dots redefine nanobiomedicine[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 110: 110651.
- [22] CUI F, LI T, WANG D, et al. Recent advances in carbon-based nanomaterials for combating bacterial biofilm-associated infections [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 431: 128597.
- [23] DAVID M E, ION R M, GRIGORESCU R M, et al. Hybrid materials based on multi-walled carbon nanotubes and nanoparticles with antimicrobial properties[J]. *Nanomaterials(Basel)*, 2021, 11(6): 1415.
- [24] DONG Y, CHEN S, WANG Z, et al. Synergy of ultrasound microbubbles and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilm[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(4): 816-26.
- [25] KOUIJZER J J P, LATTWEIN K R, BEEKERS I, et al. Vancomycin-decorated microbubbles as a theranostic agent for *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. *Int J Pharm*, 2021, 609: 121154.
- [26] LUTHERYN G, HIND C, CAMPBELL C, et al. Bactericidal and anti-biofilm effects of uncharged and cationic ultrasound-responsive nitric oxide microbubbles on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 956808.

(收稿日期: 2023-01-10 修回日期: 2023-04-11)