



硝酸镓对烧伤创面感染常见细菌的抗菌作用观察

许钊荣 江琼 陈晓东* (福建医科大学附属协和医院福建省烧伤研究所 福建福州 350001)

摘要: 目的 观察硝酸镓溶液对烧伤创面感染常见细菌的抗菌活性,为进一步基础实验研究及将来临床应用提供实验基础。方法 选取临床烧伤创面感染常见细菌的标准菌株,包括大肠埃希菌,铜绿假单胞菌,肺炎克雷伯菌,阴沟肠杆菌,鲍曼不动杆菌,嗜麦芽窄食单胞菌,金黄色葡萄球菌,表皮葡萄球菌,粪肠球菌,采用微生物活性检测试剂盒-WST,检测硝酸镓溶液对上述细菌的最小抑菌浓度(MIC)。结果 硝酸镓溶液对大肠埃希菌和粪肠球菌的MIC为256 μ g/ml,对其余实验菌株的MIC均为512 μ g/ml。结论 硝酸镓溶液对烧伤创面感染的常见细菌均具有较高抗菌活性,在临床烧伤创面感染治疗以及提高创面敷料抗菌性能等方面有良好的应用价值,值得进一步探索与研究。

关键词: 硝酸镓 烧伤 创面感染 抗菌 最小抑菌浓度

中图分类号: R644 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187(2016)15-001-03

基金项目: 福建省科技重点项目(2014Y0056),项目名称:胶原蛋白-甲壳胺纳米银烧伤创面抗菌敷料的研制及对烧伤深II度创面修复的临床前研究;国家临床重点专科建设项目(卫办医政函[2012]649号);福建省临床重点专科建设项目

Antimicrobial effect of gallium nitrate against bacteria in burn wound infection

Xu Zhaorong, Jiangqiong, Chen Xiaodong* (Fujian Institute of Burns, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fujian Fuzhou, 350001)

Abstract: **Objective** To investigate the antimicrobial effect of gallium nitrate against nine strains of bacteria which are common in burn wound infection, and provide a sound basis for further research and clinical application. **Methods** Nine microbial strains, including Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Acinetobacter baumannii, Stenotrophomonas maltophilia were selected. Microbial Viability Assay Kit-WST was used for measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) of gallium nitrate against these strains. **Results** The MIC was 256 μ g/ml for Escherichia coli and Enterococcus faecalis, and 512 μ g/ml for the rest strains tested. **Conclusions** Gallium nitrate exhibits strong antimicrobial effect against bacteria common in burn wound infection, which deserves further research for the potential role of wound infection treatment and wound dressings improvement.

Key words: gallium nitrate burn wound infection antimicrobial the minimum inhibitory concentration

烧伤患者创面皮肤粘膜组织损害,炎性介质渗出及坏死组织溶解液化,是细菌生存及播散的优良培养基,加之严重烧伤患者免疫功能低下,细菌容易侵袭邻近正常组织并侵入血液,引发全身感染脓毒血症,危及患者生命。由于细菌耐药性的不断出现,新型抗菌剂的研究成为热点。镓(gallium, Ga)是一种过渡金属元素,目前临床上已有多种含镓的化合物被用于治疗癌症和高钙血症,其有效性和安全性得到肯定^[1, 2]。硝酸镓(gallium nitrate)是镓的三价化合物,文献报道,其对多种细菌包括铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌有抗菌作用^[3-7],由于镓离子(Ga³⁺)具有与铁相近的离子半径,能竞争性地阻断Fe³⁺与蛋白质和螯合剂结合,抑制了依赖于铁电子的氧化-还原反应,干扰细菌的DNA和蛋白质合成^[3]。本研究选取临床烧伤创面感染常见的细菌,系统性观察硝酸镓溶液对实验菌株的抗菌作用。

1 材料与方法

1.1 菌株: 选取临床烧伤创面感染常见细菌的标准菌株,包括革兰阴性菌:大肠埃希菌(ATCC25922),铜绿假单胞菌(ATCC27853),肺炎克雷伯菌(FSCC167002),阴沟肠杆菌(FSCC145003),鲍曼不动杆菌(ATCC19606),嗜麦芽窄食单胞菌(ATCC51331),革兰阳性菌:金黄色葡萄球菌(ATCC25923),表皮葡萄球菌(FSCC223011),粪肠球菌(FSCC146002),均购于广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 试剂与仪器: 硝酸镓购自Sigma-Aldrich公司;微生物活性检测试剂盒-WST购自日本同仁化学研究所;胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基,脑心浸提液(BHI)培养基,水解酪蛋白胨(MH)培养基购自广东环凯微生物科技有限公司;无菌96孔板为美国Corning公司产品,酶标仪为Bio-Rad iMARK。

1.3 硝酸镓对烧伤创面感染常见细菌的最小抑菌浓度(MIC): 采

用微生物活性检测试剂盒-WST,因实验的灵敏度(O.D.值)与微生物细胞的种类和代谢活性有关,故实施预实验找出适宜的接种细菌浓度和染色时间。各标准菌株于琼脂培养基划线培养24h,挑取单个菌落接种至新制相应液体培养基,37 $^{\circ}$ C,150rpm过夜培养,借助麦氏浊度仪比浊法使用无菌生理盐水将菌液稀释至预期浓度。硝酸镓溶液(过滤除菌)使用MH培养基倍比稀释制备成不同浓度溶液,浓度:1024、512、256、128、64、32、16、8、4、2 μ g/ml,分别取180 μ l上述溶液加入无菌96孔板的第1至10孔,第11孔加MH肉汤180 μ l为阳性对照,第12孔加MH肉汤190 μ l为阴性空白对照,第1至11每孔接种菌液10 μ l,每孔做3次重复。上样完毕后,盖好盖板,置35 $^{\circ}$ C培养箱培养6h。随后,每孔加入10 μ l WST试剂盒染色溶液,于35 $^{\circ}$ C继续培养2-3h。测定前每孔加入10 μ l 0.2%EDTA溶液,混匀充分溶解后,用酶标仪测定在450nm处吸光度,与空白对照组OD值相比差异小于0.05的该孔相对应的溶液浓度定义为MIC^[8, 9]。

2 结果

2.1 WST试剂盒各菌株适宜接种浓度: 根据WST试剂盒操作步骤,将过夜培养后的菌液根据麦氏浊度仪比浊法制备10⁷CFU/ml的菌悬液,进行梯度稀释,将稀释后各梯度菌悬液分别接种96孔板,经过35 $^{\circ}$ C、6h培养后加入染色溶液,再经过2-3h培养后酶标仪测定450nm处吸光度,选取O.D.值在2-4范围内的浓度为最适接种浓度,结果见表1。

表1: WST试剂盒各菌株适宜接种浓度

菌株(G+)	浓度(CFU/ml)	菌株(G-)	浓度(CFU/ml)
大肠埃希菌	5 \times 10 ³	金黄色葡萄球菌	10 ⁵
铜绿假单胞菌	5 \times 10 ⁷	表皮葡萄球菌	10 ⁷
肺炎克雷伯菌	5 \times 10 ³	粪肠球菌	10 ⁴
阴沟肠杆菌	10 ⁴		
鲍曼不动杆菌	5 \times 10 ³		
嗜麦芽窄食单胞菌	10 ⁷		

2.2 硝酸镓溶液对烧伤创面感染常见细菌的MIC(μ g/ml): 硝酸镓浓度较高的培养基溶液存在部分絮状沉淀,为消除絮状沉淀对吸光

作者简介:许钊荣(1987-),男,籍贯:福建龙岩,汉族,现职称住院医师,主要从事烧伤治疗与创面修复。

*通讯作者:陈晓东(1968-),男,籍贯:福建福州,汉族,主任技师,主要从事烧伤后免疫、感染和瘢痕防治等基础和临床研究。



度测定的干扰及对菌体生物量测定的影响,在酶标仪测定前每孔加入 $10 \mu\text{l}$ 0.2% EDTA 溶液^[10],混匀充分溶解后测定 450nm 处吸光度,绘制曲线图 1A&B。曲线图 1A 显示,在实验菌株革兰阴性菌中,随着硝酸镓溶液浓度的不断上升,在 $16\text{--}64 \mu\text{g/ml}$ 时各菌株的药敏曲线开始下降,提示细菌的生长开始受到抑制。随着浓度的继续上升,到 $256\text{--}512 \mu\text{g/ml}$ 时,各菌株的药敏曲线接近于空白对照值,提示细菌生长受到完全抑制,基于 WST 试剂盒 MIC 的定义^[8, 9],此处浓度即为硝酸镓溶液对该菌株的最小抑菌浓度 (MIC)。革兰阳性菌株药敏曲线 (图 1B) 中也提示相同现象。硝酸镓对大肠埃希菌和粪肠球菌的 MIC 为 $256 \mu\text{g/ml}$,对铜绿假单胞菌,肺炎克雷伯菌,阴沟肠杆菌,鲍曼不动杆菌,嗜麦芽窄食单胞菌,金黄色葡萄球菌,表皮葡萄球菌的 MIC 均为 $512 \mu\text{g/ml}$,见表 2。

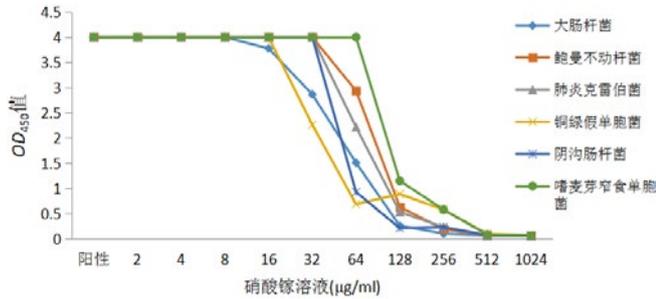


图 1A 硝酸镓溶液药敏实验曲线 (G-)

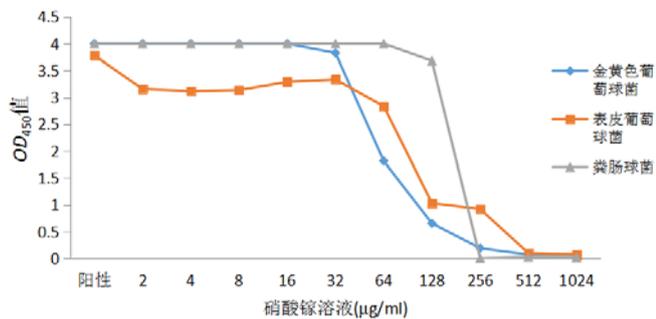


图 1B 硝酸镓溶液药敏实验曲线 (G+)

表 2: 硝酸镓溶液对烧伤创面感染常见细菌的 MIC

菌株 (G-)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	菌株 (G+)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
大肠埃希菌	256	金黄色葡萄球菌	512
铜绿假单胞菌	512	表皮葡萄球菌	512
肺炎克雷伯菌	512	粪肠球菌	256
阴沟肠杆菌	512		
鲍曼不动杆菌	512		
嗜麦芽窄食单胞菌	512		

3 讨论

创面感染是烧伤患者最常见,同时又是最棘手的并发症之一,烧伤创面充血、水肿、坏死,成为细菌生存及播散的良好培养基,严重时引发全身感染脓毒症,危及患者生命。资料显示^[11-15],烧伤创面感染菌中以革兰阴性菌检出率高,其中分别为铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌及嗜麦芽窄食单胞菌,而革兰阳性菌分别为金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌及粪肠球菌。目前创面感染治疗主要以抗生素为主,但由于耐药性的不断出现,新型抗菌剂的研究成为热点,无机抗菌剂就是其中一类。镓化合物已被广泛应用于医学领域,近年来其抗菌活性也备受关注。硝酸镓不同于常见的抗生素,是一种无机抗菌剂,具有特殊的优势。铁是微生物生长以及维持关键酶功能不可缺少的元素,三价铁离子 (Fe^{3+}) 在体内参与氧化-还原过程转变为二价铁离子 (Fe^{2+}),产生的电子在 DNA 合成,呼吸链和关键酶的功能和氧化应激防御反应中均有重要作用。镓离子 (Ga^{3+}) 具有与铁离子相近的离子半径,能竞争性地阻断 Fe^{3+} 与蛋白质和螯合剂结合,但 Ga^{3+} 细菌体内不能被还原,抑制了依赖于铁电子捕获的氧化-还原反应,干扰细菌的 DNA 和蛋白质合成^[3, 16]。

本研究系统地观察了硝酸镓溶液对烧伤创面感染常见细菌的抗

菌作用,尚属首次。其一,实验结果显示,硝酸镓对创面感染常见细菌的 MIC 为 $256\text{--}512 \mu\text{g/ml}$,对革兰阴性菌和阳性菌具有几乎相同的作用,说明其抗菌作用具有广谱性,这与其抗菌原理相关,提示在感染创面局部使用硝酸镓溶液,可基本覆盖病原菌。其二,由于三价铁离子 (Fe^{3+}) 在病原体内的氧化-还原过程中扮演关键角色,而镓离子 (Ga^{3+}) 通过竞争性阻断 Fe^{3+} 而干扰 DNA 和蛋白质合成的抗菌原理,使细菌不易通过常见的如产生药物失活酶、改变靶位点、改变代谢途径等方式产生耐药性。其三,亦有文献报道^[17],将硝酸镓涂于聚氯乙烯片表面,可减少细菌在表面的聚集并抑制了生物膜的形成,提示硝酸镓可合成在生物材料中(如创面敷料),发挥抗菌功能并抑制生物膜形成。同仁化学研究所产品微生物活性检测试剂盒-WST,是一种全新的通过比色法检测微生物代谢活性的试剂盒,采用 WST-8 作为比色指示剂,通过电子载体被细胞内的脱氢酶还原为水溶性的橙黄色甲臞染料,生成的甲臞量与活细胞数量成正比,从而可以简单、快速的进行微生物活性检测。与传统的微量肉汤稀释法^[18]相比,该试剂盒检测时间明显缩短,检测灵敏度与传统实验相当^[19],作为一种简单、快速、有效的 MIC 检测方法,值得推广。硝酸镓已通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 的批准使用于临床,安全性高。本研究结果显示,硝酸镓溶液对烧伤创面感染常见的细菌均有较高抗菌活性,为进一步基础实验研究及将来临床应用提供了基础,为烧伤创面感染治疗以及创面敷料的抗菌性能研究提供了新思路。

参考文献

- [1] Bernstein L R. Mechanisms of therapeutic activity for gallium[J]. Pharmacological Reviews, 1998, 50(4): 665-682.
- [2] Chen D, Frezza M, Shakya R, et al. Inhibition of the proteasome activity by gallium(III) complexes contributes to their anti prostate tumor effects[J]. Cancer Research, 2007, 67(19): 9258-9265.
- [3] Kaneko Y, Thoendel M, Olanmi O, et al. The transition metal gallium disrupts Pseudomonas aeruginosa iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity[J]. The Journal of clinical investigation, 2007, 117(4): 877.
- [4] Antunes L C, Imperi F, Minandri F, et al. In vitro and in vivo antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2012, 56(11): 5961-5970.
- [5] 吴浩昕,李蓉,葛新.硝酸镓对临床分离金黄色葡萄球菌生物膜的体外清除作用[J].中国感染控制杂志,2015,14(4):223-226.
- [6] 葛新,王辉,董小青.硝酸镓对尿路致病性大肠埃希菌及其生物膜的抑制作用[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(2):136-139.
- [7] 郑淑华,穆小萍,黄瑞玉,等.铁螯合剂和硝酸镓对碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌生长的影响[J].广东医学,2016,37(4):489-491.
- [8] Tsukatani T, Suenaga H, Higuchi T, et al. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(1): 109-116.
- [9] Tsukatani T, Higuchi T, Suenaga H, et al. Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 393(1): 117-125.
- [10] 赵良贵,薛晓春,杨素萍.含无机盐沉淀菌悬液中微生物生长量的快速测定[J].中国生物工程杂志,2011,31(2):91-94.
- [11] Cooper R, Bjarnsholt T, Alhede M. Biofilms in wounds: a review of present knowledge[J]. Journal of wound care, 2014, 23(11): 570-582.
- [12] 潘忠兰,章宏伟,史京萍,等.慢性创面感染患者创面细菌分布及菌株耐药性分析[J].江苏医药,2015,41(16):1949-1950.

(下转第 4 页)



图2: 胸骨骨折应用镍钛记忆合金接骨板开放复位内固定术后侧位X线, 示骨折解剖复位, 接骨板固定稳妥。

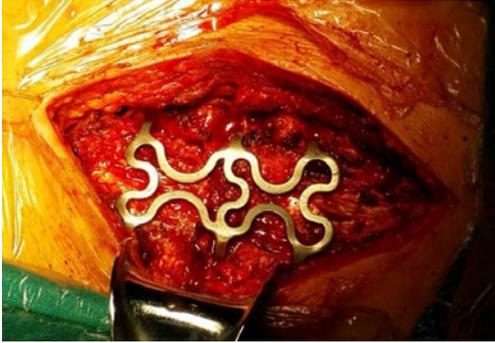


图3: 术中胸骨正中切口, 解剖复位胸骨, 并应用镍钛记忆合金接骨板固定好胸骨。

2 结果

18例患者均手术顺利, 平均手术时间(47±2.5)min, 无死亡病例。18例患者住院时间13~27d。1例患者因合并颅脑和心脏损伤术后给予呼吸机辅助呼吸, 其余17例术后即拔除气管内插管。所有患者术后胸痛明显缓解, 呼吸改善, 术后2周复查胸部X线片骨折断端无移位, 无纵隔脏器损伤、纵隔感染、切口感染等发生, 未出现接骨器松动或脱位现象, 未出现局部皮肤不适或前胸活动受限等症状, 均痊愈出院, 其中1例患者出院后因合并心脏三尖瓣瓣膜腱索断裂需至上级医院行进一步手术治疗。所有患者术后3个月复查, 1例患者有轻度胸痛不适, 其余患者无胸痛不适。所有患者影像学检查提示骨折对位良好, 胸骨骨折均临床愈合, 无骨不愈合发生, 接骨器无脱落松动现象。

3 讨论

胸骨骨折在胸部损伤发生率为1.5%~2.5%, 比较少见^[3]。胸骨骨折的部位以胸骨体骨折最常见, 约占76.5%, 其次为胸骨柄骨折, 约占9%, 胸骨柄、体交界处骨折约占8.5%^[4]。胸骨骨折是否需要手术固定在国内外存在一些分歧。以前认为若胸骨骨折没有发生移位则可不需手术治疗, 只有明显骨折移位的患者则建议行手术内固定^[5, 6]。但Molina^[7]对12例单纯胸骨骨折手术固定的患者长达17年的随访, 结果认为手术使患者获益更多。他主张大多数胸骨骨折需要行内固定手术, 积极的外科干预可以使疼痛减轻, 避免患者后期出现驼背姿势, 以及上肢活动触发的慢性疼痛, 并使胸廓恢复它的完整性和稳定性。目前大多数学者主张对胸骨骨折患者在全身情况稳定后, 尽早行手术复位固定, 避免假关节形成及由其引起的疼痛, 可以使住院时间缩短,

早期手术较为简单, 效果也满意。

目前胸骨骨折的固定方法有钢丝固定或克氏针固定、记忆合金胸骨固定器固定^[9]、钛板固定^[10]。传统的胸骨固定手术一般采用钢丝或克氏针固定^[8], 因胸骨后是心脏和大血管, 传统方法存在心脏大血管损伤风险, 一旦出现, 后果极其严重。另外胸骨后手术操作空间小, 穿引钢丝比较困难, 且需要游离胸骨前后骨膜, 会影响胸骨血供。另外钢丝固定的胸骨稳定性差, 钢丝断裂或移位, 钢丝纵形牵拉对胸骨的切割张力, 不规则骨折或粉碎性骨折时效果不佳, 尤其对于老年患者, 由于骨质疏松加上咳嗽等影响, 容易导致钢丝切割胸骨, 导致骨折延迟愈合或不愈合。镍钛记忆合金胸骨接骨板环抱于上下肋间环抱胸骨, 固定效果可靠, 温度回复后恢复原有形状, 且镍钛记忆合金与组织相容性极好, 可以终生不予取出。

我们体会: 根据外伤史、胸部局部压痛、骨擦感、胸骨畸形, 结合胸部侧位X线、胸部CT三维成像检查可明确胸骨骨折的诊断, 并以此判定骨折的严重程度。胸骨骨折的治疗应根据实际情况作出选择。单纯性胸骨骨折, 无明显移位或者稳定性骨折患者可采取保守治疗, 但需卧床休息, 积极镇痛, 采用中医中药活血化瘀处理。有移位的胸骨骨折根据伤情决定手术时机, 如合并重要脏器损伤或连枷胸者或大量血气胸需行急诊手术; 合并多根肋骨骨折者宜选择伤后48h, 可以避开肺挫伤造成的肺水肿、肺不张, 减少手术麻醉使肺挫伤进一步加重, 但一般最好不超过2周, 以免因组织水肿、粘连, 骨性骨痂形成, 导致分离困难并造成较大的创伤。选择应用镍钛记忆合金胸骨接骨板治疗胸骨骨折, 是一个简单有效实用的好方法。

参考文献

- [1]Brookes JG, Dunn R J, Rogers I R. Sternal fractures: a retrospective analysis of 272 cases[J]. J Trauma, 1993, 35(1):46-54.
- [2]李谦平, 成少飞, 赵永红, 等. 创伤性胸骨骨折的外科治疗[J]. 创伤外科杂志, 2014, 16(2):113-115
- [3]顾恺时. 胸心外科手术学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003:557.
- [4] von Garrel T, Ince A, Junge A, et al. The sternal fracture: radiographic analysis of 200 fractures with special reference to concomitant injuries[J]. J Trauma, 2004, 57(4): 837-844.
- [5]王洪斌, 张明, 刘海林, 等. 创伤性胸骨骨折的诊断与治疗[J]. 创伤外科杂志, 2011, 13(4): 348-348.
- [6]胡敏, 潘铁成, 魏翔, 等. 创伤性胸骨骨折22例诊治分析[J]. 创伤外科杂志, 2009, 10(3): 209-210.
- [7]Molina JE. Evaluation and operative technique to repair isolated sternal fractures[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130(2): 445-448.
- [8]Parmaksizog lu AS, Sökücü S, Ozkaya U, et al. Locking plate fixation of three and four part proximal humeral fractures. Acta Orthop Traumatol Turc, 2010, 44(2): 97-104.
- [9]杨明德. 记忆合金环抱式接骨器治疗胸骨骨折11例[J]. 实用临床医学, 2012, 13(12): 82-103.
- [10]Schulz-Drost S, Mauerer A, Grupp S, et al. Surgical fixation of sternal fractures: locked plate fixation by low-profile titanium plates surgical safety through depth limited drilling[J]. International Orthopaedics 2014, 38(1):133-139.

(上接第2页)

[13]黄学忠, 胡招正, 林佩佩, 等. 烧伤病房五年间细菌分布与耐药性分析[J]. 中华烧伤杂志, 2012, 28(3):227-229.

[14]陈粹, 范友芬, 邹薇薇, 等. 烧伤患者创面感染病原菌分布及药敏分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(4):841-842.

[15]仁亮, 李红毅, 张旖丽. 312例下肢创伤性皮肤溃疡创面真菌感染情况分析[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(5):293-294.

[16]Olakanmi O, Gunn J S, Su S, et al. Gallium disrupts iron uptake by intracellular and extracellular Francisella strains and exhibits therapeutic efficacy in a murine pulmonary infection

model[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2010, 54(1): 244-253.

[17]朱元元, 杨双旺, 邱彦. 硝酸镓可降解涂层的体外抗菌实验[J]. 东南国防医药, 2014, 16(4):346-348.

[18]Cockerill F R. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard [M]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

[19]Tskatania T, Suenagaa H, Shigab M, et al. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 90(90): 160-166.