

· 论 著 ·

## 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 和壳聚糖作为人工植入物涂层的抗菌性研究\*

李思燮<sup>1</sup>, 余果宇<sup>1</sup>, 翟国敏<sup>2</sup>, 高振华<sup>2</sup>, 申吉泓<sup>2△</sup>, 彭滢程<sup>1</sup>

(1. 昆明医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500;

2. 昆明医科大学第一附属医院泌尿外科, 云南昆明 650000)

**摘要:**目的 探讨蛇毒抗菌肽 OH-CATH 和壳聚糖(几丁糖)作为人工植入物涂层对大肠埃希菌的抑菌效果。方法 预处理导尿管和涤纶补片(对照组、几丁糖组、头孢组 and 抗菌肽组)后进行体外抑菌试验,测定各组 1 d 及将其置入血浆中 7 d 后对大肠埃希菌标准株(*E. coli* ATCC 25922)和耐头孢菌素大肠埃希菌临床耐药株的抑菌活性值 U。结果 在 *E. coli* ATCC 25922 中,头孢组和抗菌肽组在 1、7 d 均有很强的抑菌效果,头孢组的抑菌活性均强于抗菌肽组( $P < 0.05$ );在 *E. coli* 耐药株中,头孢组无抑菌活性,而抗菌肽组在 1、7 d 有显著抑菌活性( $P < 0.01$ )。结论 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 对 *E. coli* ATCC 25922 及耐药株均有显著的抑菌效果,并肯定了它应用于人工植入物涂层的价值。

**关键词:**蛇毒;抗菌肽;OH-CATH;壳聚糖;大肠埃希菌;假体和植入物

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)11-1287-03

## Research on antibacterial property of snake venom antibacterial peptide OH-CATH and chitosan as artificial implant coating\*

Li Siman<sup>1</sup>, Yu Guoyu<sup>1</sup>, Zhai Guomin<sup>2</sup>, Gao Zhenhua<sup>2</sup>, Shen Jihong<sup>2△</sup>, Peng Yancheng<sup>1</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Kunming Medical

University, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. First Affiliated Hospital,

Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650000, China)

**Abstract:** Objective To explore the bacteriostatic efficacy of snake venom antibacterial peptide OH-CATH and chitosan as artificial implant coating on *Escherichia coli* (*E. coli*). Methods The catheters and dacron patches (blank group, chitosan group, cefoperazone group and antibacterial peptide group) were performed the pretreatment. Then the in vitro bacteriostatic test was conducted to evaluate the antibacterial activity U value on *E. coli* ATCC 25922 and cephalosporin-resistant *E. coli* on 1 d and on 7 d after putting it into plasma. Results The cefoperazone group and the antibiotic peptide group had the very powerful antibacterial activity on *E. coli* ATCC 25922 on 1, 7 d, but the antibacterial activity of the cefoperazone group was stronger than that of the antibiotic peptide group ( $P < 0.05$ ); the cefoperazone group had no antibacterial activity on cephalosporin-resistant *E. coli*, but the antibiotic peptide group had significantly antibacterial activity on 1, 7 d ( $P < 0.01$ ). Conclusion Snake venom antibacterial peptide OH-CATH has very obvious antibacterial effect on the standard strain and drug-resistant strain of *E. coli* and its value applied in artificial implant coating is affirmed.

**Key words:** snake venom; antibiotic peptide; OH-CATH; chitosan; *Escherichia coli*; prostheses and implants

随着导尿管、人造心脏瓣膜和人工关节等人工植入物的广泛应用,其并发症中的植入物相关感染成为临床医生亟待解决的问题<sup>[1]</sup>。控制植入物感染需长期依赖抗菌药物,甚至更换新的植入物,感染严重可导致患者死亡<sup>[2]</sup>。泌尿系人工植入物最易形成细菌生物膜,目前用环丙沙星、庆大霉素、呋喃西林及诺氟沙星等抗菌药物预处理导尿管对预防及延缓留置导尿管相关性尿路感染发生有一定的作用<sup>[3]</sup>,但耐药菌的不断产生使其抗感染作用不能持久。蛇毒来源的抗菌肽对许多临床耐药微生物显示了极强的体外抗菌活性,具有极低的细胞毒性且在血浆中能保持抗菌活性<sup>[4]</sup>。同时,人类泌尿道表达分泌抗菌肽(hLL-37),在感染时上皮细胞增加抗菌肽的表达来保护泌尿道<sup>[5]</sup>。本实验选取蛇毒抗菌肽 OH-CATH 和壳聚糖(几丁糖)凝胶作为生物涂层,以导尿管和涤纶补片作为人工植入物代表来进行体外研究,以探讨降低人工植入物感染的方法。

## 1 材料与方法

1.1 材料 细菌:将普通大肠埃希菌(*E. coli* ATCC 25922)和

耐头孢菌素大肠埃希菌临床耐药株(*E. coli* 耐药株,由昆明医科大学第一附属医院检验科分离并鉴定)分别接种于 LB 培养基后 37℃ 过夜培养,次日将菌液“Z”字形接种于肉汤平板,37℃ 过夜培养获得菌落,取单个菌落加入 LB 培养液后置 37℃ 恒温摇床,次日获得 *E. coli* ATCC 25922 和耐药株纯种菌液。蛇毒抗菌肽的制备:蛇毒抗菌肽 OH-CATH 由吉尔生化(上海)有限公司合成,实验样品由中科院“动物模型与人类疾病机制”重点实验室“生物毒素与人类疾病”学科组提供。

## 1.2 方法

1.2.1 导尿管和涤纶补片的预处理 参照文献[6-7]利用浸涂法将导尿管(Bard 公司, Foley 10 号单腔导尿管)和涤纶补片分别进行处理。对照组:无涂布;几丁糖组:涂几丁糖凝胶;头孢组:涂头孢哌酮钠、几丁糖凝胶(头孢哌酮终浓度为 10 mg/mL);抗菌肽组:涂抗菌肽、几丁糖凝胶(抗菌肽终浓度为 0.2 mg/mL),且每组刷涂剂量均相等。将 4 组中部分导尿管段和涤纶补片 70℃ 烤箱固化 1 h 后行体外抑菌实验,此部分标记

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160302);云南省应用基础研究面上资助项目(2011FZ117)。作者简介:李思燮(1981—),讲师,硕士研究生,主要从事外科肿瘤与分子生物学研究。△ 通讯作者, Tel:18669228069; E-mail:kmsjh99@yahoo.com.cn。

为 1 d;其余导尿管段和涤纶补片置入血浆中并 4 ℃ 保存,7 d 后再行抑菌实验,此部分标记为 7 d。

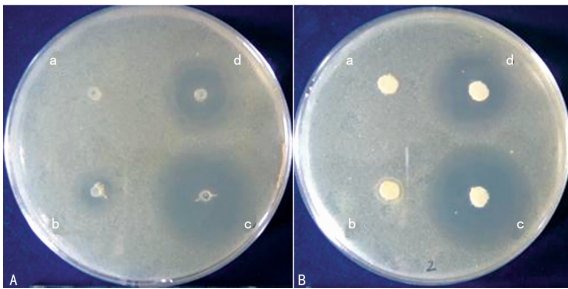
**1.2.2 抑菌试验** 采用琼脂扩散法<sup>[8]</sup>,将 E. coli ATCC 25922 (终浓度为  $10^5 \sim 10^6$  cfu/mL)加入 20 mL 底层培养基[为 1% 低熔点琼脂糖(Sigma A6013)和 0.3 mg/mL 胰蛋白酶(Oxoid 产品)溶于 10 mmol/L pH 7.4 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4^- \text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液],并均匀摊布于培养皿中待凝固,将涤纶补片和导尿管植入底层培养基并于 37 ℃ 恒温箱孵育 3 h,覆盖顶层培养基(将底层培养基中胰蛋白酶改为 0.6 mg/mL)后 37 ℃ 过夜培养,测量抑菌圈直径。将 E. coli ATCC 25922 改为 E. coli 耐药株,重复上述实验测量抑菌圈直径。

**1.2.3 测量并计算抗菌活性** 抗菌活性单位  $U = [\text{抑菌环直径}(\text{mm}) - 3.3/5.0] \times 10$  (其中导尿管和涤纶补片的直径分别为 3.3、5.0 mm)。此实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。对样本数先行方差齐性检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 导尿管和涤纶补片的体外抑菌环比较** 预处理 1 d 的导尿管和涤纶补片对 E. coli ATCC 25922 抑菌活性代表性结果,见图 1。



A: 导尿管抑菌圈; B: 涤纶补片抑菌圈; a: 对照组; b: 几丁糖组; c: 头孢组; d: 抗菌肽组。

图 1 导尿管和涤纶补片的体外抑菌环图(1 d)

表 1 1 d 后导尿管和涤纶补片抗菌活性比较( $\bar{x} \pm s, U, n=3$ )

组别	E. coli ATCC 25922		E. coli 耐药株	
	导尿管	涤纶补片	导尿管	涤纶补片
对照组	0	0	0	0
几丁糖组	$6.7 \pm 5.8$	0	$5.5 \pm 3.9$	$0.0 \pm 0.0$
头孢组	$226.7 \pm 15.3$	$226.7 \pm 20.8$	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
抗菌肽组	$123.3 \pm 15.3^b$	$133.3 \pm 15.3^b$	$101.2 \pm 9.1^c$	$114.6 \pm 9.5^c$

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 不同菌株间同组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>c</sup>:  $P < 0.01$ , 与同种菌株头孢组比较。

表 2 7 d 后导尿管和涤纶补片抗菌活性比较( $\bar{x} \pm s, U, n=3$ )

组别	E. coli ATCC 25922		E. coli 耐药株	
	导尿管	涤纶补片	导尿管	涤纶补片
对照组	0	0	0	0
几丁糖组	0	0	0	0
头孢组	$126.7 \pm 5.8$	$110.0 \pm 20.0$	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
抗菌肽组	$53.3 \pm 5.8^b$	$56.7 \pm 11.5^b$	$24.1 \pm 4.4^{bc}$	$26.7 \pm 5.8^{bc}$

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 不同菌株间同组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>c</sup>:  $P < 0.01$ , 与同种菌株头孢组比较。

**2.2 导尿管和涤纶补片的抗菌活性单位比较** 与对照组和几丁糖组比较,头孢组对 E. coli ATCC 25922 的抑菌性强于 E. coli 耐药株,对 E. coli 耐药株几乎无抑菌性。抗菌肽组对 E. coli ATCC 25922 的抑菌性强于 E. coli 耐药株,第 7 天,抗菌肽组对 E. coli 耐药株仍有抑菌性。头孢组对 E. coli ATCC 25922 的抑菌性显著强于抗菌肽组,但对 E. coli 耐药株几乎无抑菌性,而抗菌肽组对 E. coli ATCC 25922 和 E. coli 耐药株均有持续抑菌性。见表 1、2。

## 3 讨 论

几丁糖分子中的-OH 和-NH 极性基团使其成为亲水性、强吸附力和极易成膜的生物涂层<sup>[9-11]</sup>。几丁糖凝胶无毒无刺激、无热原性、无免疫抗原性,不溶血且具有热稳定性,无致突变、致死等不良反应,还有轻微抑菌作用<sup>[12]</sup>,用几丁糖凝胶预处理导尿管和涤纶补片可以增加平滑度及润滑度,阻碍病原菌黏附于人工植入物而起到抑制感染的作用。几丁糖凝胶对蛇毒抗菌肽 OH-CATH 和头孢哌酮的固定和缓释作用使其长期发挥抑菌性,从而达到长期抗菌的效果。

抗菌肽是生物体在抵抗病原微生物的防御反应过程中产生的一类具有抗微生物活性的小分子多肽<sup>[13]</sup>。蛇毒来源的内源性抗菌多肽类物质对许多临床耐药微生物显示了极强的体外抗菌活性,并具有极低的细胞毒性以及溶血活性( $>400$  g/mL),同时,在高的盐浓度(1% NaCl)以及血浆存在下也保持其抗菌活性,显示了较高的临床应用前景<sup>[14]</sup>。有文献报道,使用高速原子力显微镜拍摄抗菌肽作用于 E. coli 及其耐药株的即时动态影像,发现存活的 E. coli 及其耐药株全部被抗菌肽杀死<sup>[14]</sup>。

在本实验中,对 E. coli ATCC 25922 及 E. coli 耐药株的抑菌检测显示,几丁糖组对导尿管的抑菌活性分别为  $(6.7 \pm 5.8)$  U 和  $(5.5 \pm 3.9)$  U,但在血浆中浸泡 7 d 后抑菌活性为 0 U,说明了几丁糖本身具有轻微的抑菌活性,但不持久也不稳定。头孢组导尿管和涤纶补片的抑菌活性均强于抗菌肽组( $P < 0.05$ ),且头孢组和抗菌肽组在血浆中浸泡 7 d 后仍然有很强的抑菌效果,提示头孢哌酮和蛇毒抗菌肽 OH-CATH 对 E. coli ATCC 25922 均有强而持久的抑菌性。在 E. coli 耐药株中,头孢组无抑菌性,而抗菌肽组在 1 d 及血浆中浸泡 7 d 均有显著抑菌性( $P < 0.01$ ),说明蛇毒抗菌肽 OH-CATH 对耐头孢菌素 E. coli 耐药株表现出持续且强大的抑菌性。

通过膀胱给药的家兔泌尿系感染模型中,使用蛇毒抗菌肽 OH-CATH 的 E. coli ATCC 25922 及耐药株的家兔中段尿培养细菌阳性率明显降低,而头孢哌酮可降低 E. coli 引起感染的阳性率,但对其耐药株引起感染的阳性率无明显作用。同时,使用抗菌肽的家兔膀胱组织中炎症细胞浸润,坏死及钙化组织等炎症反应较头孢哌酮少<sup>[15]</sup>。蛇毒抗菌肽 OH-CATH 对包括耐药菌株在内的 E. coli 有稳定的抑菌活性,对膀胱组织也起到了一定保护作用,而头孢哌酮对于 E. coli ATCC 25922 引起感染有一定保护作用,但对耐药菌引起的感染无明显作用。家兔感染实验和本实验的结论基本一致,均提示蛇毒抗菌肽对普通及耐头孢菌素的 E. coli 有明显且稳定的抑菌作用。

蛇毒抗菌肽 OH-CATH 应用于人工植入物有普通抗菌药物无法比拟的优越性,不仅在血浆中有持久的抑菌效果,对临床耐药菌株也有强大而持久的抑菌性,蛇毒抗菌肽 OH-CATH 应用于人工植入物涂层有巨大的应用价值,为抵抗耐药微生物提供了有效的依据,可为蛇毒抗菌肽的临床应用奠定

一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Zimmefli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(16):1645-1654.
- [2] Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(14):1422-1429.
- [3] Ha US, Cho YH. Catheter-associated urinary tract infections; new aspects of novel urinary catheters[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 28(6):485-490.
- [4] Zhao H, Gan TX, Liu XD, et al. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes [J]. *Peptides*, 2008, 29(10):1685-1691.
- [5] Zhang BY, Li SM, Gao ZH, et al. Protective effects of snake venom antimicrobial peptide OH-CATH on *E. coli* induced rabbit urinary tract infection models[J]. *Zoolog Res*, 2013, 34(1):27-32.
- [6] Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Tarsi R, et al. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*[J]. *Biomacromolecules*, 2001, 2(1):165-169.
- [7] Cruz J, Kawasaki M, Gorski W. Electrode Coatings Based on Chitosan Scaffolds[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(4):680-686.
- [8] Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, et al. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides[J]. *Immunol Methods*, 1991, 137(2):167-173.
- [9] Chen Y, Mant CT, Farmer SW, et al. Rational design of alpha-helical antimicrobial Peptides with enhanced activities and specificity/ therapeutic index[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(13):12316-12329.
- [10] Wang Y, Hong J, Liu X, et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics [J]. *PLoS One*, 2008, 3(9):e3217.
- [11] Chen XX, Yu GY, Zhang Y, et al. Effects of the Antimicrobial Peptide OH-CATH on *Escherichia coli*[J]. *Zoolog Resh*, 2009, 30(2):171-177.
- [12] Kavitha K, Sutha S, Prabhu M, et al. In situ synthesized novel biocompatible titania-chitosan nanocomposites with high surface area and antibacterial activity[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 93(2):731-739.
- [13] 周继章. 抗菌肽抗病的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(7):204-208.
- [14] Fantner GE, Barbero RJ, Gray DS, et al. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy[J]. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5(4):280-285.
- [15] 张白羽, 李思嫚, 高振华, 等. 蛇毒抗菌肽 OH-CATH 对大肠杆菌引起家兔泌尿系感染的保护作用[J]. *动物学研究*, 2013, 34(1):25-32.
- (收稿日期:2013-09-14 修回日期:2013-12-24)
- (上接第 1286 页)
- et al. Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer; a review of published data[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2010, 75(2):94-109.
- [6] Cao XJ, Dai N, Yi WJ, et al. Preparation and characterization of rabbit anti-human apurinic/aprimidinic endonuclease(APE1) polyclonal antibody[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2009, 5(4):325-327, 331.
- [7] Toffart AC, Timsit JF, Couraud S, et al. Immunohistochemistry evaluation of biomarker expression in non-small cell lung cancer(Pharmacogenoscan study)[J]. *Lung Cancer*, 2014, 83(2):182-188.
- [8] Kang CH, Jang BG, Kim DW, et al. The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and beta III-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection[J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(3):478-483.
- [9] Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC[J]. *Lung Cancer*, 2011, 71(1):3-10.
- [10] Kotoula V, Krikelis D, Karavasilis V, et al. Expression of DNA repair and replication genes in non-small cell lung cancer (NSCLC): a role for thymidylate synthetase (TYMS)[J]. *BMC cancer*, 2012(12):342.
- [11] Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, et al. BRCA1; a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2007, 2(11):e1129.
- [12] Tanaka F, Wada H, Fukui Y, et al. Thymidylate synthase (TS) gene expression in primary lung cancer patients; a large-scale study in Japanese population[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(8):1791-1797.
- [13] Joerger M, deJong D, Burylo A, et al. Tubulin, BRCA1, ERCC1, Abraxas, RAP80 mRNA expression, p53/p21 immunohistochemistry and clinical outcome in patients with advanced non small-cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy[J]. *Lung Cancer*, 2011, 74(2):310-317.
- [14] Wu HH, Chu YC, Wang L, et al. Cytoplasmic ape1 expression elevated by p53 aberration may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20 Suppl 3:S336-347.
- [15] Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, et al. RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(29):4731-4737.
- (收稿日期:2013-12-08 修回日期:2014-02-10)