

乙酸抗细菌生物膜作用的研究进展

高欣欣 金正花 陈欣欣 于家傲

Advances in the progress of anti-bacterial biofilms properties of acetic acid Gao Xinxin, Jin Zhenghua, Chen Xinxin, Yu Jia'ao. Department of Burn Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130061, China

Corresponding author: Yu Jia'ao, Email: 814218885@qq.com

【Abstract】 Bacterial biofilms are considered to be the hindrance in the treatment of chronic wound, because of their tolerance toward antibiotics and other antimicrobial agents. They also have strong ability to escape from the host immune attack. Acetic acid, as a kind of organic weak acid, can disturb the biofilms by freely diffusing through the bacterial biofilms and bacterial cell membrane structure. Then the acid dissociates to release the hydrogen ions, leading to the disorder of the acid-base imbalance, change of protein conformation, and the degradation of the DNA within the membranes. This paper reviews the literature on the characteristics and treatment strategies of the bacterial biofilms and the acetic acid intervention on them, so as to demonstrate the roles acetic acid may play in the treatment of chronic wound, and thus provide a convincing treatment strategy for this kind of disease.

【Key words】 Biofilms; Infection; Acetic acid; Chronic wound

【关键词】 生物膜; 感染; 醋酸; 慢性创面

细菌生物膜因其独特的组织结构,而对抗生素及其他抗菌物质有极强的耐药性^[1]。美国疾病控制中心相关数据表明,65%~80%的人类细菌感染与细菌生物膜有关,50%的院内感染与医疗器械装置上的细菌生物膜有关^[2-3]。细菌生物膜已经成为慢性感染迁延不愈,手术及局部给药治疗效果不佳的主要原因之一。乙酸作为抗菌剂及防治瘟疫的药物已有 6 000 多年的历史^[4]。最新实验表明,乙酸具有确切的抑制及清除细菌生物膜的作用,但因其作用机制及毒性和不良反应尚未明确,无法在临床得到广泛应用。本文旨在通过概述细菌生物膜的特点、主要治疗方法及乙酸抗细菌生物膜作用的研究进展,进一步明确乙酸在慢性感染治疗中的重要意义。

1 细菌生物膜的特点及治疗方法

自然界中的细菌主要有 2 种生长形式,即单细胞生长和黏附聚集生长。浮游细菌主要采用前一种形式,多种细菌或菌落及其外层形成的细菌生物膜主要采用后一种形式。细菌生物膜形成的过程可以概括为 4 个阶段:细菌的黏附,菌落的形成及扩增,细菌生物膜的成熟,细菌生物膜的裂解及裂解后细菌的播散^[5]。细菌生物膜通过分泌胞外聚合物

(EPS) 形成包裹多种细菌的保护层^[6],帮助细菌生物膜抵御外界环境及抗生素和其他抗微生物制剂的渗入。EPS 主要由细胞外大分子组成,包括核酸、蛋白质、多糖以及脂质^[7]。细菌生物膜特有的结构特征还使其具有极强的逃避宿主免疫攻击的能力^[1]。20 世纪 80 年代,一系列的体内及体外实验表明,细菌的聚集生长是引起临床慢性感染的重要原因。随后 10 余年,医学领域开展了多项细菌生物膜相关的体内及体外实验,更深入地验证了细菌生物膜导致临床多种慢性感染的理论,包括移植物及导管的感染、人工心脏瓣膜感染、牙菌斑的形成、肺囊性纤维化、中耳炎、慢性创面以及慢性骨髓炎。

细菌生物膜理论的提出使慢性感染的治疗迈出了重要一步,临床上主要的治疗方法有合理应用抗生素,局部抗菌物质的使用及去除感染灶。近 10 年,越来越多的研究者认为全身使用抗生素可以在很大程度上控制伤口感染^[8]。但成熟的细菌生物膜对普通治疗剂量甚至高剂量的抗生素极度不敏感,故单纯使用抗生素依然无法达到有效控制及抑制细菌生物膜的目的。选择合适的局部抗菌敷料及抗菌剂,对于防止及控制细菌生物膜形成和增长具有重要意义。银离子敷料是目前临床应用较为广泛的一种抗菌保湿敷料,Stobie 等^[9]的研究阐明了银离子敷料可以有效抑制表皮葡萄球菌黏附在物体表面,进而抑制细菌生物膜的形成。但含银敷料长期使用的毒性和不良反应尚需实验加以证实。局部皮肤抗菌剂包括硝酸银、醋酸磺胺米隆、碘伏、磺胺嘧啶银及氯己定等,但研究表明,上述这些传统的抗菌剂常规剂量并无明显的抑制及清除细菌生物膜的效果^[4]。且 Wilson 等^[10]提出,皮肤局部抗菌剂长期使用可能会损伤 Fb 和 KC,导致创面愈合延迟。针对有细菌生物膜相关感染的慢性创面,彻底清创是去除细菌生物膜的黄金标准,通过这种方法能够去除失活的组织并破坏细菌生物膜^[11],但这种有创的方式不仅给患者带来极大痛苦,且易残留部分游离细菌,容易再次形成细菌生物膜。上述治疗方法均无法有效抑制细菌生物膜的形成及增长,故细菌生物膜的治疗成为医学领域亟须解决的难题。

2 乙酸的制备及使用历史

酸性环境的建立是控制细菌生长的重要方法之一^[12]。20 世纪 60 年代,有机酸在食品安全领域即得到广泛使用,主要用于抗食物变质腐烂。近年来,有机酸及酸性催化剂仍然在抗菌及酸性环境的构建方面起着重要作用。与无机酸相比,有机酸具有更广谱的抑制病原体生长代谢及破坏微生物的作用。有机酸可以未解离的酸性化合物的形式自由通过膜性结构,到达膜内后,酸性化合物发生解离,释放出氢离子,导致细胞内 pH 值下降,细菌细胞内环境发生改变,从而达到抗菌的效果。



目前研究证实的具有抗菌及抗细菌生物膜作用的有机酸主要有透明质酸及乙酸。体外实验证明,透明质酸可以有效抑制呼吸道相关菌群的生长及细菌生物膜的发展和成熟。乙酸是一种无色、有刺激性气味的有机酸。乙酸的制备主要有 2 种方法,即人工合成法和生物发酵法。前者主要以甲醇或乙醛为原料,利用工业催化剂进行化学反应制备乙酸;后者主要以乙醇、粮食或者糖类为原料,在醋酸菌属及梭菌属的作用下发酵得到乙酸。乙酸不仅是食品领域常用的防腐剂及果蔬消毒剂,也可作为医用的创面及防治瘟疫的抗菌剂^[4]。1916 年, Taylor 首次使用体积分数 1% 的乙酸,历时 2 周治愈了铜绿假单胞菌感染的战伤创面。随后几年,乙酸成功治愈了耳部、胸部及尿路的假单胞菌感染。20 世纪中期,医学界开始研究乙酸的抗菌作用,且经体外实验证明乙酸具有抗菌效果,对革兰阴性菌的抑制效果优于革兰阳性菌。

3 乙酸抗细菌生物膜作用

研究表明,酸性环境的建立对于细菌生物膜的形成具有重要影响^[13]。Nostro 等^[14]的研究显示,pH 值为 5.0 和 6.0 时,乙酸、乳酸及盐酸对金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌均有抑制作用及抗其细菌生物膜的作用。pH 值为 5.0 时抗菌及抗细菌生物膜能力由强到弱依次为乙酸、乳酸、盐酸;上调 pH 值到 6.0 时,3 种酸抗细菌生物膜能力强弱没有改变,但对细菌生物膜的抑制作用均有所下降。因实验设定的 2 种 pH 值均大于乙酸及乳酸的解离常数 pKa (分别为 4.75、3.86),而更接近于乙酸的 pKa,在此条件下,未解离状态的乙酸要多于乳酸,因此乙酸抗细菌生物膜的能力强于乳酸。故研究者认为,酸性物质对于细菌生物膜的抑制效果主要取决于酸的类型及 pH 值。

Bjarnsholt 等^[15]的研究显示,体积分数 0.5% 的乙酸在连续作用 24 h 后,可将铜绿假单胞菌野生型菌株形成的成熟细菌生物膜完全清除;完全清除金黄色葡萄球菌野生型菌株形成的成熟细菌生物膜则需要体积分数 1% 的乙酸,而相同体积分数的盐酸对上述 2 种细菌的成熟细菌生物膜均没有清除效果。乙酸的 pH 值小于其 pKa 时,对于铜绿假单胞菌形成的细菌生物膜具有明显的清除效果,而同样 pH 值的盐酸对铜绿假单胞菌形成的细菌生物膜清除效果不明显。不同 pH 值(均小于 5.0)的乙酸与妥布霉素、环丙沙星、多黏菌素联合作用于细菌生物膜的清除效果明显优于乙酸单独使用。该研究明确了乙酸体外抗细菌生物膜的作用效果,并描述了乙酸在临床应用中与负压吸引疗法联合作用于慢性感染创面的确切治疗效果。

Halstead 等^[16]指出,乙酸对创面感染相关的 29 种细菌的最小抑菌体积分数为 0.16% ~ 0.31%,抑制细菌生物膜形成的最低体积分数为 0.31%,清除细菌生物膜的体积分数区间是 0.31% ~ 5.00%,而相同 pH 值的盐酸并没有抗铜绿假单胞菌或鲍氏不动杆菌生物膜的作用。

综上,乙酸具有体外抗细菌生物膜形成及清除细菌生物膜的作用,且其抗细菌生物膜的作用与溶液中的氢离子浓度没有直接关系。乙酸等弱有机酸抗菌及抗细菌生物膜能力的主要机制在于未解离状态的酸可以自由扩散通过膜的疏水层,破坏膜内微环境的阳离子及阴离子平衡,导致进入细

胞内的乙酸开始解离、游离的氢离子逐步累积,细胞内蛋白降解、膜性结构及 DNA 结构损坏。

4 总结与展望

细菌生物膜是目前临床治疗慢性感染需要攻克的难题,明确乙酸抑制及清除细菌生物膜的作用无疑将给临床细菌生物膜及慢性感染的治疗带来希望。故笔者认为有必要开展进一步的实验研究,明确不同状态、不同体积分数的乙酸在不同 pH 值环境下,抗菌及抗细菌生物膜作用的具体机制及影响因素,从分子及基因水平明确乙酸及酸性环境对基因调控及分子表达的影响。

乙酸的产生途径之一是由糖在酵母菌、醋酸菌或梭菌的作用下经过两步法或一步法发酵而得的,目前临床上高渗糖治疗慢性创面的疗效显著^[17],那么是否可以假设糖在作用于创面后,是通过产生乙酸起到了抗感染及促进创面愈合的作用的呢?如果假设成立,我们可以通过活体实验探索促进高渗糖转变为乙酸的条件,从而规避乙酸使用过程中产生的刺痛感及异味等不足,及可能发生的酸中毒风险。

尽管乙酸作为抗菌剂使用历史悠久,由于新兴生物技术的迅猛发展,这种传统的抗菌剂逐渐被人遗忘,但对于乙酸的临床及基础研究近 2 年逐渐兴起,研究者们开始聚焦乙酸对于细菌生物膜的抑制作用。也正因为如此,本文可引用的参考文献时间跨度较大,且近 5 年文献较少。

参考文献

- [1] Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections [J]. *APMIS*, 2013, 121(Suppl 136):1-51. DOI: 10.1111/apm.12099.
- [2] Paredes J, Alonso-Arce M, Schmidt C, et al. Smart central venous port for early detection of bacterial biofilm related infections [J]. *Biomed Microdevices*, 2014, 16(3):365-374. DOI: 10.1007/s10544-014-9839-3.
- [3] Epstein AK, Hochbaum AI, Kim P, et al. Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry [J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(49):494007. DOI: 10.1088/0957-4484/22/49/494007.
- [4] Rysse H, Kloeters O, Germann G, et al. The antimicrobial effect of acetic acid—an alternative to common local antiseptics? [J]. *Burns*, 2009, 35(5):695-700. DOI: 10.1016/j.burns.2008.11.009.
- [5] Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, et al. The in vivo biofilm [J]. *Trends Microbiol*, 2013, 21(9):466-474. DOI: 10.1016/j.tim.2013.06.002.
- [6] Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 65(2):127-145. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x.
- [7] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9):623-633. DOI: 10.1038/nrmicro2415.
- [8] 曾艳妮, 黄金, 仇铁英. 细菌生物膜对慢性伤口的影响及防治策略 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(24):3925-3930. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2014.24.025.
- [9] Stobie N, Duffy B, McCormack DE, et al. Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(8):963-969. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.10.057.

[10] Wilson JR, Mills JG, Prather ID, et al. A toxicity index of skin and wound cleansers used on in vitro fibroblasts and keratinocytes [J]. *Adv Skin Wound Care*, 2005, 18(7):373-378.

[11] 付小兵. 细菌生物膜形成与慢性难愈合创面发生[J]. *创伤外科杂志*, 2008, 10(5):416-417. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4237.2008.05.015.

[12] Raftari M, Jalilian FA, Abdulmir AS, et al. Effect of organic acids on Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus contaminated meat [J]. *Open Microbiol J*, 2009, 3:121-127. DOI:10.2174/1874285800903010121.

[13] Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, et al. A microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation [J]. *New Microbiol*, 2010, 33(2):137-145.

[14] Nostro A, Cellini L, Ginestra G, et al. Staphylococcal biofilm formation as affected by type acidulant [J]. *APMIS*, 2014, 122(7):648-653. DOI: 10.1111/apm.12210.

[15] Bjarnsholt T, Alhede M, Jensen PØ, et al. Antibiofilm properties of acetic acid [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2015, 4(7): 363-372. DOI: 10.1089/wound.2014.0554.

[16] Halstead FD, Rauf M, Moiemem NS, et al. The antibacterial activity of acetic acid against biofilm-producing pathogens of relevance to burns patients [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136190. DOI: 10.1371/journal.pone.0136190.

[17] 赵景春, 咸春静, 于家傲, 等. 高渗葡萄糖纱布联合简易负压封闭引流技术治疗会阴部感染创面一例[J]. *中华烧伤杂志*, 2012, 28(5):390-391. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.05.023.

(收稿日期:2015-12-22)
(本文编辑:程林)

本文引用格式

高欣欣, 金正花, 陈欣欣, 等. 乙酸抗细菌生物膜作用的研究进展 [J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(6):382-384. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.06.017.

Gao XX, Jin ZH, Chen XX, et al. Advances in the progress of anti-bacterial biofilms properties of acetic acid [J]. *Chin J Burns*, 2016, 32(6): 382-384. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.06.017.

· 消息 ·

第十届全国创伤修复(愈合)与组织再生学术会议通知

由中华医学会创伤学分会创伤修复和组织再生专业委员会与中国医师协会创伤外科医师分会创面修复医师专业委员会主办,福建医科大学附属协和医院、福建省医学会烧伤外科学分会和福建省烧伤治疗质量控制中心承办的“第十届全国创伤修复(愈合)与组织再生学术会议”拟定于2016年9月9—11日在福建省福州市召开,会议主题为“重视组织修复与再生的创新与转化”,本次会议系国家级继续医学教育项目,编号:2016-04-14-216(国)。会议期间将举办第三届中欧创面修复学术会议和中国医师协会创伤外科医师分会创面修复医师专业委员会会议。大会将邀请国内外专家参会并作精彩演讲,欢迎全国烧伤、创伤及组织再生相关领域的同道踊跃参会并积极投稿。

会议时间:2016年9月9日全天报到,2016年9月10—11日学术会议。会议地点:福建省福州市世纪金源大饭店(福州市温泉公园路59号)。

征文内容:(1)创/烧伤修复与组织再生的基础研究。(2)急、慢性创面的临床治疗。(3)干细胞、组织工程、生物材料等与创伤修复和组织再生。(4)传统医学与创伤修复和组织再生。(5)内脏损伤发生机制与修复。(6)机体其他部位的损伤与修复。(7)创伤修复相关的护理问题。(8)与创伤修复和组织再生相关治疗产品研发与产业化研究等。

征文要求:(1)未在公开发行的期刊上发表的论文。(2)论文摘要600字左右,包括目的、方法、结果、结论4个部分。(3)请通过网站(<http://CTRS2016.fjxhburn.com>)或邮箱(fj_burn@sohu.com)投稿,不接受纸质投稿,截稿日期为2016年7月15日。联系人为江琼(13365917329)、许钊荣(13599037497)、金昌丹(15880105239)。

中华医学会创伤学分会创伤修复和组织再生专业委员会
中国医师协会创伤外科医师分会创面修复医师专业委员会

广告目次

汇涵术泰(苏州汇涵医用科技发展有限公司)	封二
捷迈取皮刀[捷迈(上海)医疗国际贸易有限公司]	对中文目次2
金扶宁(长春金赛药业有限责任公司)	对英文目次1
阿敷祺(深圳市源兴纳米医药科技有限公司)	对英文目次2
MEEK植皮机(上海贵群经贸有限公司)	对正文
那格银(南昌银威医用科技有限公司)	封底