

# 细菌生物膜与慢性难愈性创面的研究进展

李翠<sup>1</sup>, 纪康<sup>2</sup>, 罗斌杰<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大连医科大学研究生院, 辽宁 大连

<sup>2</sup>泰州市人民医院烧伤整形外科, 江苏 泰州

Email: 972154016@qq.com

收稿日期: 2021年3月15日; 录用日期: 2021年4月13日; 发布日期: 2021年4月21日

## 摘要

慢性难愈性创面的防治一直是目前创面研究与临床工作中的重点和难点。近年来, 针对该类创面的相关研究显示, 各种细菌微生物为了适应周围环境而在该类创面中以生物膜的形式呈持续、混合存在, 并可在生物膜的保护下不断增殖、分泌毒性因子, 同时增强自身耐药性, 削弱抗生素的杀菌作用, 导致创面感染持续存在、愈合困难。因此, 为了更好地指导慢性难愈性创面的防治, 本文就慢性难愈性创面的分类、生物膜的组成与形成机制、生物膜影响创面愈合可能的机制、以及目前针对细菌生物膜的临床防治手段等做简要综述。

## 关键词

慢性创面, 生物膜, 创面修复, 治疗

# Research Progress of Bacterial Biofilms and Chronic Refractory Wounds

Cui Li<sup>1</sup>, Geng Ji<sup>2</sup>, Binjie Luo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Dalian Medical University, Dalian Liaoning

<sup>2</sup>Department of Burn and Plastic Surgery, Taizhou People's Hospital, Taizhou Jiangsu

Email: 972154016@qq.com

Received: Mar. 15<sup>th</sup>, 2021; accepted: Apr. 13<sup>th</sup>, 2021; published: Apr. 21<sup>st</sup>, 2021

## Abstract

The prevention and treatment of chronic refractory wounds have been the focus and difficulty in wound research and clinical work. In recent years, research on this type of wound has shown that various kinds of bacteria and micro-organisms exist in the form of biofilm continuously and they

are mixed together to exist in order to adapt to the surrounding environment. And they can proliferate and secrete toxic factors under the protection of biofilm. At the same time, they can enhance their drug resistance, weaken the bactericidal effect of antibiotics, resulting in persistent wound infection and healing difficulty. Therefore, in order to guide the prevention and treatment of chronic refractory wounds better, this article reviews the classification of chronic refractory wounds, the composition and formation mechanism of biofilm, the possible mechanism of biofilm affecting wound healing, and the current clinical prevention and treatment of bacterial biofilm.

## Keywords

Chronic Wound, Biofilm, Wound Repairing, Treatment

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

目前,慢性难愈性创面的防治受到了社会各界的广泛关注,该类创面之所以称之为“慢性”,主要是由于创面愈合超过了正常组织愈合所需要的时间;而目前国内外针对该时间长短尚无统一定义。早期部分学者认为创面经正规治疗达3个月后,创面仍旧未愈合或无愈合倾向者可称之为慢性创面[1],而另有学者认为该时间达4~6周则可称之为慢性创面[2]。临床上根据慢性难愈性创面的病因大致可分为:静脉性、缺血性、创伤性、感染性、恶性、压力损伤性、代谢性以及其它(如脉管炎、医源性等)8个种类[3]。而在慢性难愈性创面组织修复的过程中,由于基础疾病复杂多样、创面感染重和坏死组织易残留等多种因素的相互作用,致使慢性难愈性创面的治疗亦十分困难。手术清创引流与非手术治疗方法是目前临床治疗首选,如:物理治疗、封闭负压引流技术(Vacuum sealing drainage, VSD)、新型敷料的应用、生长因子类药物、干细胞移植疗法、富血小板血浆(Platelet-rich plasma, PRP)以及基因治疗等[4]。

结合现有研究来看,慢性难愈性创面的形成与创面局部微环境情况(如温度、湿度、PH值、氧含量、生物膜形成等)、细胞因子、细胞外基质含量、修复细胞和炎性细胞等多种因素的相互作用有关[5]。而创面持续性感染是使得创面迁延不愈的主要原因之一,并且有研究显示,60%~80%的感染与创面细菌生物膜的形成有关[6][7]。因此,在临床工作中,我们应充分了解细菌生物膜的形成机制和细菌微生物特点,并在此基础上进行深入研究,为慢性难愈性创面提供更好的防治方案。

## 2. 细菌生物膜定义与组成

细菌生物膜(Bacterial biofilm, BF)的这一概念,很好的定义了细菌为了适应周围环境而在自然界中形成的一种生存状态。当局部环境因素(如:温度、湿度、PH以及氧含量等)发生改变时,细菌为了更好的存活、增殖,免受外界环境的破坏,首先粘附在生物体或者多聚物表面,相互作用不断聚集形成细菌团块;随着细菌数量的累积而形成成熟稳定的生物膜;最后,当破坏因素去除时,部分细菌或细菌团块将与生物膜分离,而播散至远处,开始启动下一个形成周期[8]。细菌要经过四个阶段形成生物膜,即:可逆性粘附定植、不可逆性集聚、生物膜成熟、菌落脱落与再定植;细菌在前两个阶段,主要以单个浮游细菌为存在形式,而在后两个阶段,细菌的存在形式则主要以菌落群体为主;另外,第一、四两个阶段,细菌具有较强的活动性,能以浮游细菌和菌落的状态向远处播散;而中间阶段,细菌播散能力减弱,持

续粘附、增殖形成菌落，同时进行胞外多糖分泌，形成稳定成熟的生物膜以免受外界环境的破坏，这一特点，不仅反应了细菌的变化方式，也在一定程度上解释了细菌耐药性的形成原因[9]。

大部分细菌都有形成生物膜的能力，并且在同一生物膜中可同时存在革兰阳性菌、兼性厌氧菌、专性厌氧菌及杆状细菌等数十种细菌。当周围环境适宜某一种或者几种细菌生存、繁殖时，那该类细菌则成为生物膜中的主要细菌种类，即主要致病菌。早期有研究者通过对不同慢性创面分泌物进行培养发现，金黄色葡萄球菌、肠球菌、假单胞菌的检出率分别占 93.5%、71.7%、52.2% [10]。细菌及其产物、细胞外基质 (Extracellular polymeric substance, EPS) 以及坏死组织是生物膜的主要组成成分；其中细胞外基质是一种特殊的三维网状结构，由细菌合成与分泌的多糖、蛋白质、细胞外 DNA (eDNA) 等组成，具有稳定生物膜结构、提供营养能量、交换遗传信息等多种作用[11]。另外，就细胞外基质中的多糖来看，大部分均无菌种特异性，但也存在个例，如金黄色葡萄球菌生物膜中的多糖胞间黏附素和铜绿假单胞菌中的三种多糖(藻酸盐、Pel、Psl) [8]，这些特殊物质的存在也突出了细菌生物膜的特异性，进一步为临床检验提供了依据。

### 3. 细菌生物膜影响创面愈合的作用机制

在生物膜形成后，细菌不断繁殖并分泌毒性因子从而影响炎性细胞的作用，导致创面愈合延迟。结合目前研究来看，生物膜延迟创面愈合的机制可归纳如下：

#### 3.1. 抑制机体免疫作用，延缓创面细胞修复

在创面的正常修复过程中，机体可通过中性粒细胞、巨噬细胞等进行吞噬创面周围细菌及坏死组织，从而发挥免疫作用，同时释放大量细胞因子促进伤口愈合。但在慢性创面中，由于细菌生物膜的存在，机体正常免疫过程被抑制，成纤维细胞修复重建延迟，从而导致创面愈合困难[12]。一方面，机体炎性细胞不能有效渗透生物膜细胞外基质，从而难以进入生物膜内部发挥吞噬作用；另一方面，在细菌群体感应(Quorum sensing, QS)的调控作用下，生物膜中的细菌可分泌大量毒性因子[13]，例如铜绿假单胞菌分泌的鼠李糖脂，其可破坏中性粒细胞，使其崩解释放大量溶细胞酶、弹性蛋白酶、金属蛋白酶，损伤邻近的健康组织，帮助细菌向周围扩散[14]；金黄色葡萄球菌生物膜可合成分泌  $\alpha$  溶血毒素，进而抑制创面上皮角化细胞生长并加速诱导其凋亡[15] [16]。

#### 3.2. 增强细菌耐药性，导致创面持续感染

生物膜形成之后，被膜菌的耐药性明显提升，有研究显示，在对抗菌药物及各种不利因素的抵抗方面，被膜菌是浮游细菌的 3~4 倍[17]。总的来说，细菌生物膜中细菌增强耐药性的机制的形成可归纳为五个方面[18] [19] [20] [21] [22]：① 细胞外基质的物理保护：细胞外多糖、蛋白质、脂类等组成的致密复合体结构，具有良好的屏障作用，使得抗菌素难以进入生物膜内发挥作用；② 限制抗菌药物在膜内扩散：当抗菌素进入生物膜内之后，部分带电荷的多糖物质可进一步限制抗菌素在膜内扩散，减弱对深部菌群的杀伤作用；③ 上调细菌外排泵的表达水平：相较于浮游细菌而言，被膜菌的外排泵基因表达更明显，从而更有效地抵抗杀菌作用；④ 耐药基因的水平转移：细胞外基质中含有不同细菌分泌的 eDNA，被膜菌可通过主动或被动的形式获取耐药基因，从而获得新的遗传特性。⑤ 降低新陈代谢：在生物膜的形成周期中，为了适应周围环境，部分被膜菌可通过降低新陈代谢、抑制繁殖的方式来减少氧气、能量的消耗，这一改变可有效避免如  $\beta$ -内酰胺类抗生素对细菌的作用。

### 4. 基于细菌生物膜的创面治疗措施

综合目前研究来看，细菌生物膜的存在可导致创面持续感染，最终导致慢性创面的形成。因此，如何有效去除生物膜、杀灭细菌、防治感染，将对创面治疗具有重要意义。

#### 4.1. 清除坏死组织

在慢性创面形成过程中,残留于创面的局部异物、分泌物以及坏死组织等均可成为细菌良好的培养基,并为其生存、增殖提供养分,进一步为细菌生物膜的形成打下基础。因此,在治疗过程中,应尽早、有效的清除创面坏死组织,尽可能减少细菌残留,促进肉芽组织形成,保障创面愈合。手术清创利用手术刀或机械(如超声或水刀等新技术)如通过物理方式可直接将坏死组织、生物膜去除,改慢性创面为急性创面,从而加速创面修复[23]。虽然手术清创是目前去除坏死组织最有效的办法,但在临床工作中,针对部分不能承担手术风险的患者,则可借助床旁少量多次清创、蛆虫疗法等方式去除创面失活组织,促进创面愈合[24]。但在创面清创之后,局部生物膜被破坏,大量被膜菌被释放出来,具有导致炎症急性发作或感染向深部侵袭的风险,因此在清创之后应及时联合抗生素或其他治疗方式,从而保护创面,防治感染。

#### 4.2. 合理应用抗生素

抗生素的使用是杀灭细菌的又一重要手段,但由于细菌生物膜中胞外基质的物理保护作用以及细菌耐药性的增强,使得抗生素的杀菌作用大打折扣。因此,在创面治疗中,应充分结合细菌耐药机制和生物膜结构的形成特点,做到科学、合理应用抗生素。在抗生素的选择方面,应尽可能的选择渗透性较强、生物膜清除作用较好的药物[19];另外,由于细菌生物膜中同时存在多种细菌,故在某些创面可采用联合用药的方式破坏生物膜,杀灭细菌;例如在金黄色葡萄球菌为主的生物膜中,可联合头孢类药物和克拉霉素破坏生物膜进而杀灭细菌[25]。在生物膜形成的四个阶段中,由于细菌具有不同的活动性,因此在抗生素的使用时机方面,则应尽可能选择以浮游细菌为主要存在形式的第一、四阶段。临床工作中,创面清创后,细菌生物膜被破坏同时释放大量被膜菌时,应根据药敏结果对患者全身或局部应用抗生素,能积极消灭细菌、控制感染以及预防新生物膜的形成[26]。

#### 4.3. 创面持续负压引流技术

近年来,各种急慢性创面的临床治疗开始广泛应用持续负压引流技术,该技术可有效控制创面感染、使创面愈合时间缩短同时减轻痛苦[27]。综合目前研究来看,该技术对抑制生物膜形成、控制创面感染的作用主要为两方面:一是促使封闭环境形成,降低创面与外界细菌的接触率;其次,能及时清除创面渗液与坏死组织,改变细菌生存环境,抑制其生存[28]。除此之外,在创面冲洗引流过程中,亦可在冲洗液中加入抗生素,从而进一步增加杀菌作用,但在实际治疗过程中,应注意抗生素使用规范,避免过度使用,从而引起细菌耐药。

#### 4.4. 使用银离子抗菌敷料

在临床创面治疗中,各种敷料的合理选择与应用对创面愈合进展具有重要的作用[29]。目前大量研究显示,含银敷料可有效杀灭生物膜中的铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等,具有良好的抗菌、破坏生物膜作用[30]。一方面,含银敷料弹性及粘附性较好,固定于创面更加稳定,将创面细菌与外界环境隔离;另一方面,高浓度活性银离子可破坏细菌细胞壁,从而起到杀灭细菌的作用。含银敷料不仅可以单独使用,亦可与其他治疗技术结合;有研究显示,就抗菌作用来看,联合应用负压引流技术与银离子抗菌敷料的抗菌作用是单独使用银离子敷料的十倍[31]。这也提示我们,创面的治疗过程中,不仅要掌握不同的治疗技术,还应充分了解各项治疗技术的优缺点,将不同的方法联合应用,以取得1+1大于1的治疗效果。

#### 4.5. 其他治疗方式

随着对细菌生物膜形成机理、组成成分、空间结构的深入了解,许多有针对性破坏细菌生物膜的物质、技术也随之被纳入慢性创面的研究与治疗中。有研究表明,D-氨基酸类物质可通过抑制细菌的粘附

与聚集、促进细菌生物膜分散的作用,进一步使细菌从生物膜中游离出来,以便于抗生素对细菌的杀灭[32]。在传统医学中,蜂蜜也被应用于创面的治疗中,结合现有研究显示:蜂蜜可对生物膜中的细菌产生杀灭作用,而这可能与蜂蜜渗透性较强,可破坏生物膜结构有关[33]。另外,在慢性创面的防治研究过程中发现:高压氧、抗菌肽、噬菌体、超声波、等离子体等多项新兴技术亦对细菌生物膜具有一定的破坏作用[34][35][36]。尽管其中机理目前尚未完全明确,但也为创面的治疗提供了新的思路与方向。

## 5. 结语

总的来看,细菌生物膜的形成明显增加了创面感染率;如何有效防止生物膜形成、彻底清除创面细菌,目前仍无确切的办法。因此,在未来的研究与临床工作中,我们应更加系统地掌握细菌生物膜形成以及延迟创面修复过程的相关机制,并据此提升创面修复技术,为慢性难愈性创面的预防与治疗提供更多更好的选择。

## 参考文献

- [1] Frank, W., et al. (2008) Chronic Wound Care. *The Lancet*, **372**, 1860-1862. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61793-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61793-6)
- [2] 刘旭盛. 慢性创面的诊断与治疗进展[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2013, 8(6): 8-12.
- [3] 廖新成, 郭光华. 慢性难愈性创面的分类鉴别及临床评估[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2017, 12(4): 303-305.
- [4] 董炜, 肖玉瑞, 吴敏洁, 等. 中国慢性难愈性创面诊疗思路及原则[J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34(12): 868-873.
- [5] 刘磊. 慢性难愈性创面形成机制的研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(13): 177-180.
- [6] Pozo, D. (2018) Biofilm-Related Disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **16**, 51-56. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
- [7] James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., et al. (2008) Biofilms in Chronic Wounds. *Wound Repair and Regeneration*, **16**, 37-44. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>
- [8] 于家傲, 高欣欣. 细菌生物膜与慢性创面感染[J]. 中华烧伤杂志, 2019(12): 842-847.
- [9] 龚寅, 李瑶琴, 黄希. D-亮氨酸对变异链球菌生物膜形成的影响[J]. 口腔生物医学, 2019, 10(1): 26-28.
- [10] Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jensen, P.Ø., et al. (2008) Why Chronic Wounds Will Not Heal: A Novel Hypothesis. *Wound Repair and Regeneration*, **16**, 2-10. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x>
- [11] Cavaliere, R., Ball, J.L., Turnbull, L., et al. (2014) The Biofilm Matrix Destabilizers, EDTA and DNaseI, Enhance the Susceptibility of Nontypeable Hemophilus Influenzae Biofilms to Treatment with Ampicillin and Ciprofloxacin. *Microbiology Open*, **3**, 557-567. <https://doi.org/10.1002/mbo3.187>
- [12] 陈梦越, 李乐之. 慢性伤口细菌生物膜相关微环境的研究进展[J]. 中华护理杂志, 2016, 51(12): 1483-1486.
- [13] Askoura, M., Saleh, M. and Abbas, H. (2020) An Innovative Role for Tenoxicam as a Quorum Sensing Inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*, **202**, 555-565. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01771-4>
- [14] Wood, T.L., Gong, T., Zhu, L., et al. (2018) Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* Disperse the Biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, **4**, 22. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0066-1>
- [15] Oliveira, D., Borges, A. and Simões, M. (2018) *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins*, **10**, E252. <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>
- [16] Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., et al. (2015) Biofilm Formation Mechanisms and Targets for Developing Antibiofilm Agents. *Future Medicinal Chemistry*, **7**, 493-512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- [17] 李雅倩, 胡同平. 金黄色葡萄球菌毒力因子的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(17): 2712-2716.
- [18] Jolivet-Gougeon, A. and Bonnaure-Mallet, M. (2014) Biofilms as a Mechanism of Bacterial Resistance. *Drug Discovery Today: Technologies*, **11**, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.003>
- [19] 李昕, 曾洁, 王岱, 等. 细菌耐药耐受性机制的最新研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(2): 113-121.
- [20] Taylor, P.K., Yeung, A.T. and Hancock, R.E. (2014) Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Towards the Development of Novel Anti-Biofilm Therapies. *Journal of Biotechnology*, **191**, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003>

- [21] Nagler, M., Insam, H., Pietramellara, G., *et al.* (2018) Extracellular DNA in Natural Environments: Features, Relevance and Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 6343-6456. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9120-4>
- [22] Salisbury, A.M., Woo, K., Sarkar, S., *et al.* (2018) Tolerance of Biofilms to Antimicrobials and Significance to Antibiotic Resistance in Wounds. *Surgical Technology International*, **33**, 59-66.
- [23] Kawecki, M., Mikuś-Zagórska, K., Glik, J., *et al.* (2015) The Efficiency of Burn Wounds Debridement with Use of Hydrosurgery—Our Experiences. *Polskiprzegląd Chirurgiczny*, **87**, 1-5. <https://doi.org/10.1515/pjs-2015-0010>
- [24] Bertesteanu, S., Triaridis, S., Stankovic, M., *et al.* (2014) Polymicrobial Wound Infections: Pathophysiology and Current Therapeutic Approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, **463**, 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.012>
- [25] Tré-Hardy, M., Macé, C., El Manssouri, N., *et al.* (2008) Effect of Antibiotic Co-Administration on Young and Mature Biofilms of Cystic Fibrosis Clinical Isolates: The Importance of the Biofilm Model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33**, 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.012>
- [26] Cooke, J. (2014) When Antibiotics Can Be Avoided in Skin Inflammation and Bacterial Colonization: A Review of Topical Treatments. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **27**, 125-129. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000044>
- [27] 程海涛, 黄桂玲, 袁颖. VSD 联合湿性愈合治疗慢性伤口效果的 Meta 分析[J]. 齐鲁护理杂志, 2017, 23(20): 36-40.
- [28] Dale, A.P. and Saeed, K. (2015) Novel Negative Pressure Wound Therapy with Instillation and the Management of Diabetic Foot Infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **28**, 151-157. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000146>
- [29] Hampton, S. (2015) Managing Biofilm by Using Dressings. *British Journal of Community Nursing*, **20**, 10-12. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2015.20.Sup6.S10>
- [30] Saeidinia, A., Keihanian, F., Lashkari, A.P., *et al.* (2017) Partial-Thickness Burn Wounds Healing by Topical Treatment: A Randomized Controlled Comparison between Silver Sulfadiazine and Centiderm. *Medicine*, **96**, E6168. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006168>
- [31] Valente, P.M., Deva, A., Ngo, Q., *et al.* (2016) The Increased Killing of Biofilms *in Vitro* by Combining Topical Silver Dressings with Topical Negative Pressure in Chronic Wounds. *International Wound Journal*, **13**, 130-136. <https://doi.org/10.1111/iwj.12248>
- [32] 闫显文, 许涛, 徐大可, 等. D-氨基酸对细菌生物膜分散作用的研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2021, 14(1): 115-117.
- [33] 魏敏, 蒋琪霞, 王琳涛. 蜂蜜对慢性伤口细菌生物膜作用的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(10): 1112-1115.
- [34] Pfalzgraff, A., Brandenburg, K. and Weindl, G. (2018) Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Frontiers in Pharmacology*, **9**, 281. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00281>
- [35] Pires, D.P., Melo, L., Vilas Boas, D., *et al.* (2017) Phage Therapy as an Alternative or Complementary Strategy to Prevent and Control Biofilm-Related Infections. *Current Opinion in Microbiology*, **39**, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.004>
- [36] Patange, A.D., Simpson, J.C., Curtin, J.F., *et al.* (2021) Inactivation Efficacy of Atmospheric Air Plasma and Airborne Acoustic Ultrasound against Bacterial Biofilms. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 2346. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81977-z>