

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2013.06.003

·专题·

结核分枝杆菌与两种人工关节介面黏附特点对比研究

包二平¹, 黄迅悟², 李洪敏², 冯会成², 董志明²

[摘要] 目的 探讨结核分枝杆菌黏附性。方法 将表面多孔涂层和羟基磷灰石涂层实验材料每组各取 20 片, 将每片实验材料在无菌条件下悬吊于 M960 培养基中, 与结核分枝杆菌共同培养。每个 M960 培养基培养 28 d。用 721 分光光度计(波长 590 nm、光镜 1.0 cm、蒸馏水调零)测定培养基菌液的光密度(OD)值。用扫描电镜观察结核分枝杆菌与两种介面的黏附情况。结果 两种材料的 OD 值无显著性差异($P>0.05$)。结核分枝杆菌在多孔介面黏附量高于羟基磷灰石涂层介面($P<0.05$)。结论 在为关节结核患者行人工关节置换时, 选择羟基磷灰石涂层比多孔涂层更有优势。

[关键词] 关节; 结核; 结核分枝杆菌; 细菌黏附; 结核感染

Adherence Condition of Mycobacterium Tuberculosis on 2 Kinds of Artificial Joint Interface BAO Er-ping, HUANG Xun-wu, LI Hong-min, et al. Department of Orthopedics, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

Abstract: Objective To compare the adherence condition of mycobacterium tuberculosis on 2 kinds of artificial joint interface. **Methods** The Chromium-Cobalt-Alloy with hydroxyapatite ceramic coating and porous coating were cocultured with the bacterial liquid of mycobacterium tuberculosis. The optical density of mycobacterium tuberculosis in different interfaces were detected by turbidimetry. Adherence conditions were observed by electron microscope scanning. **Results** There was no significant difference between two groups in the optical density value ($P>0.05$). The electron microscope scanning showed that more mycobacterium tuberculosis adhered to the porous coating than hydroxyapatite ceramic coating ($P<0.05$). **Conclusion** The hydroxyapatite ceramic coating has more advantages to the porous coating in prosthetic replacement for patients with joint tuberculosis.

Key words: joint; tuberculosis; mycobacterium tuberculosis; bacterial adhesion; tuberculosis infection

[中图分类号] R687.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2013)06-0510-03

[本文著录格式] 包二平, 黄迅悟, 李洪敏, 等. 结核分枝杆菌与两种人工关节介面黏附特点对比研究[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(6): 510-512.

髋膝关节结核在全身骨结核中约占 30%, 仅次于脊柱结核而居第二位^[1]。晚期髋膝关节结核导致严重关节缺损, 通常采用一期或二期人工关节置换重建关节功能, 但术后结核复发问题尚未解决。结核复发受多种因素影响, 包括患者的免疫功能、抗结核化疗、感染结核菌是否耐药、人工假体选择等。本研究通过体外实验观察结核分枝杆菌与两种不同人工材料表面的黏附情况, 为临床选择人工关节假体提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 结核分枝杆菌 结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis, MTB)标准株 H37Rv, 北京结核病防治所提供。

1.1.2 培养基 BACTEC MGIT 960(M960)液体培养基, 北京解放军 309 医院结核临床实验室提供, 将 40 个培养基进行编号。

1.1.3 人工关节介面材料 将钴铬钼合金(Chromium-Cobalt-Alloy, 北京航空航天设计院提供), 制成直径 5 mm、厚 1.6 mm 圆柱体, 按照人工关节表面处理工艺, 圆柱形实验材料表面分别做成多孔涂层和羟基磷灰石涂层。

1.2 实验方法

1.2.1 实验材料与结核分枝杆菌共同培养 将表面多孔涂层和羟基磷灰石涂层两组表面性状不同的实验材料每组各取 20 片, 用蒸馏水超声波震荡洗涤后, 高温消毒。在无菌条件下用 4 号线固定并且悬吊于 M960 培养基中, 每个培养基放一个样本。同时将 MTB 用生理盐水稀释浓度约为 1×10^{11} CFU/L(CFU: 集落形成单位)的细菌悬液。每个 M960 培养基分别加结核菌液 0.5 ml, 完毕后放置 M960 培养仪中, 37 °C 下震荡培养。

1.2.2 结核分枝杆菌生长情况测定 将结核分枝杆菌与

作者单位: 1.河北北方学院, 河北张家口市 075000; 2.解放军第 309 医院, 北京市 100091。作者简介: 包二平(1982-), 男, 蒙古族, 吉林白城市人, 硕士研究生, 主要研究方向: 关节外科。通讯作者: 黄迅悟。

实验材料共同培养 28 d, 每 7 天从培养两种实验材料的 M960 培养基分别各取 0.1 ml 菌液。用 721 分光光度计(波长 590 nm、光镜 1.0 cm、蒸馏水调零)测定 M960 培养基中 OD 值^[2]。

1.2.3 扫描电镜观察 将实验材料从液体培养基中取出, 用生理盐水 10 ml 冲洗 3 遍以除去表面未黏附的结核分枝杆菌, 置入 3%戊二醛中固定 4 h 后, 梯度酒精(50%、70%、80%、90%)脱水, 室温下干燥, IB-5 型重离子溅射仪表面喷金, PHILIP ESEM 30 扫描电镜下观察结核分枝杆菌在材料表面的黏附情况。每块材料随机选取 10 个视野, 计算每个视野结核分枝杆菌总数。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验, 显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 结核分枝杆菌生长情况

不同时间点, 结核分枝杆菌在两种材料表面的

OD 值均无显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

表1 结核分枝杆菌在两种材料表面培养不同时间后的 OD 值

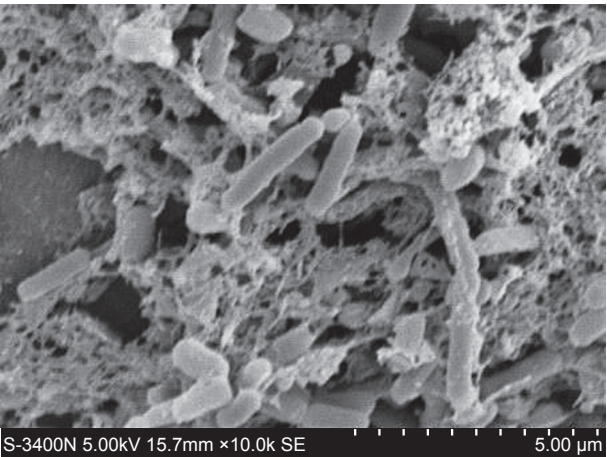
材料表面	7 d	14 d	21 d	28 d
多孔	0.21±0.003	0.053±0.005	0.085±0.004	0.092±0.003
羟基磷灰石	0.22±0.003	0.052±0.004	0.083±0.003	0.090±0.004
<i>t</i>	-0.72	0.07	1.78	1.52
<i>P</i>	0.48	0.95	0.08	0.13

2.2 电镜观察结果

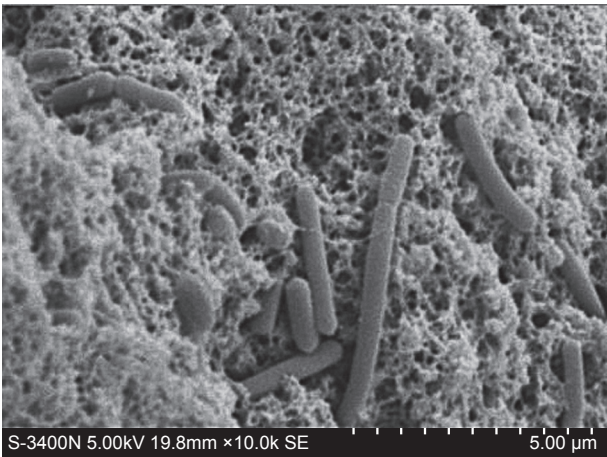
培养第 28 天结核杆菌扫描电镜所见(图 1), 多孔涂层组结核分枝杆菌黏附量明显多于羟基磷灰石涂层组($P<0.01$)。见表 2。

表2 培养第 28 天结核分枝杆菌与两种材料的平均黏附数量 (个/视野)

材料表面	材料数目	结核分枝杆菌
多孔	20	14.91±0.47
羟基磷灰石	20	6.23±0.26
<i>t</i>		73.08
<i>P</i>		0.001



多孔涂层



羟基磷灰石涂层

图1 结核分枝杆菌生长 28 d 对两种材料的黏附情况(扫描电镜, 10000×)

3 讨论

生物材料植入术后感染是从细菌与生物材料黏附开始^[3]。黏附在材料表面的细菌不断繁殖, 产生较多的细胞外黏滞物, 与细胞外基质蛋白如纤维蛋白原等共同形成一层包绕材料的生物膜。生物膜为细菌黏附提供新的位点, 加速其黏附, 同时保护细菌免受药物杀灭及机体的免疫攻击, 常规保守治疗很难奏效, 往往不得不取出内植在关节中的内固定物, 导致手术失败。

细菌黏附受生物材料表面理化性能的影响较大, 如表面化学组成、表面自由能(包括修复材料的表面

自由能、细菌的表面自由能及悬浮介质的表面张力)、表面亲水性/疏水性、表面粗糙度^[4]及其布朗运动和范德华力等物理力作用。因此, 通过改变种植体表面的物理性能, 控制致病菌黏附和聚集, 减少种植体周围组织病变, 从而提高种植体植入成功率^[5-6]。由于人工假体表面处理技术不同、光泽度、孔隙度不同, 结核分枝杆菌对不同假体介面黏附力是否存在差异尚无文献报道。

由于结核分枝杆菌属于慢生长菌, 周期为 24~36 h, 比普通细菌传代时长约 60 倍^[7]。结核分枝杆菌无菌毛、鞭毛、荚膜等黏附“配体”, 活动力差, 对各

种材料表面黏附力较弱。王鹏祥等报道结核分枝与表皮葡萄球菌对钛及钛合金材料表面的黏附力是不同的^[8]。结核分枝杆菌在机体内对生物材料的黏附是由多种蛋白质共同协作的复杂生物过程,在这个过程中主要依靠特有的黏附素。国内外对结核分枝杆菌的研究表明黏附素在结核分枝杆菌入侵、发病及播散方面有重要作用^[9],也是结核分枝杆菌与生物材料黏附的主要黏附物^[10-11]。黏附素由结核分枝杆菌自身分泌^[12],由多种蛋白构成,包括磷酸酰基醇甘露糖苷(PIM)、肝素结合血凝集黏附素(HBHA)、纤维结合蛋白(FAP)、和层粘连蛋白(LN)等。

本研究将人工假体材料植入结核菌液中共同培养28 d,两种材料对结核分枝杆菌生长无明显影响($P>0.05$)。结核分枝杆菌在多孔介面黏附量高于羟基磷灰石涂层介面($P<0.05$)。这种差异可能与两种假体介面结构、物理特性、接触角和表面能等因素影响有关。

本实验结果表明,结核分枝杆菌与人工关节假体介面有黏附力。结核分枝杆菌与多孔和羟基磷灰石涂层人工关节界面黏附有差异,关节结核患者人工关节置换,选择羟基磷灰石涂层比多孔涂层更有优势。由于我们所选取材料的表面处理与临床使用假体一致,使实验结果对关节结核患者人工假体选择提供一定参考。

[参考文献]

- [1] Wang Y, Wang J, Xu Z, et al. Total hip arthroplasty for active tuberculosis of the hip [J]. *Int Orthop*, 2010, 34(8): 1111-1114.
- [2] Ruf KM, Bensadoun ES, Davis GA, et al. A clinical-laboratory algorithm incorporating optical density value to predict heparin-induced thrombocytopenia [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105(3): 553-559.
- [3] Kim KH, Ramaswamy N. Electrochemical surface modification of titanium in dentistry [J]. *Dent Mater J*, 2009, 28(1): 20-36.
- [4] 李笑梅,郭天文,闫召民,等. 三种表面改性方法对纯钛表面膜化学组成的影响[J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2005, 6(4): 259-261.
- [5] Norowski PA Jr, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 88(2): 530-543.
- [6] Huang J, Li X, Koller GP, et al. Electrohydrodynamic deposition of nanotitanium doped hydroxyapatite coating for medical and dental applications [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(3): 491-496.
- [7] 周劲松,陈建庭,金大地,等. 结核分枝杆菌对材料粘附能的外实验研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2003, 13(11): 670-673.
- [8] 王鹏祥,赵剑,赵敦炎,等. 结核分枝杆菌在不同内固定材料表面粘附情况的实验研究[J]. *交通医学杂志*, 2007, 21(1): 11-13.
- [9] Chen WH, Jiang LS, Dai LY. Influence of bacteria on spinal implant-centered infection: an in vitro and in vivo experimental comparison between *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(2): 103-108.
- [10] 李传有,端木宏谨. 结核分枝杆菌粘附素和结核病[C]. *中国防痨协会全国学术会议论文集*, 2005: 214-215.
- [11] Sanz J, Navarro J, Arbues A, et al. The transcriptional regulatory network of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22178.
- [12] Mészáros B, Tóth J, Vértessy BG, et al. Proteins with complex architecture as potential targets for drug design: a case study of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *PLoS Comput Biol*, 2011, 7(7): e100-118.

(收稿日期:2013-03-14)