

# 新型镁合金对金黄色葡萄球菌生物学特性影响的体外研究

刘小荣<sup>1</sup> 杨国清<sup>2</sup> 梁文强<sup>2</sup> 张玉娟<sup>1</sup> 张鹏飞<sup>1</sup> 张静<sup>1</sup> 章晓波<sup>3</sup> 王勇平<sup>2▲</sup>

1. 甘肃省第二人民医院检验科, 甘肃兰州 730000; 2. 兰州大学第一医院骨科, 甘肃兰州 730000; 3. 南京工程学院材料工程学院, 江苏南京 211167

[摘要] 目的 探讨新型镁合金对金黄色葡萄球菌生物学特性的影响。方法 实验分为实验组(新型镁合金)及对照组(不含新型镁合金), 各设3个复孔, 分别进行金黄色葡萄球菌增殖实验、金黄色葡萄球菌血浆凝固酶实验、金黄色葡萄球菌溶血素实验、抗生素抑菌实验, 最后进行统计学分析。结果 细菌增殖实验结果显示, 在同一时间点不同浓度实验组 OD 值比对照组明显更低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 在不同时间点相同浓度实验组与对照组比较, OD 值明显更低( $P < 0.05$ ); 随着培养时间延长, 相同浓度实验组与对照组 OD 值之差逐渐上升( $P < 0.05$ )。金黄色葡萄球菌血浆凝固酶实验结果显示, 与对照组比较, 实验组凝集颗粒较小, 且随着培养时间延长, 凝集颗粒逐渐变小。金黄色葡萄球菌溶血素实验结果显示, 与对照组比较, 实验组  $\beta$  溶血环较小, 且随着培养时间延长,  $\beta$  溶血环逐渐减小, 而且培养 7 d 后,  $\beta$  溶血环消失。抗生素抑菌环实验结果显示, 与对照组比较, 实验组所有抗生素在第 1、3、5、7 天抑菌环直径较大, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 镁合金具有抑制金黄色葡萄球菌增殖的能力, 同时, 对其血浆凝固酶、溶血素及抗生素抑菌特性也有影响。

[关键词] 镁合金; 金黄色葡萄球菌; 生物学特性; 生物膜

[中图分类号] S852.6

[文献标识码] A

[文章编号] 2095-0616 (2024)07-0008-04

DOI:10.20116/j.issn2095-0616.2024.07.02

## In vitro study on the effect of a new magnesium alloy on the biological characteristics of *Staphylococcus aureus*

LIU Xiaorong<sup>1</sup> YANG Guoqing<sup>2</sup> LIANG Wenqiang<sup>2</sup> ZHANG Yujuan<sup>1</sup> ZHANG Pengfei<sup>1</sup>  
ZHANG Jing<sup>1</sup> ZHANG Xiaobo<sup>3</sup> WANG Yongping<sup>2</sup>

1. Department of Laboratory Medicine, the Second People's Hospital of Gansu, Gansu, Lanzhou 730000, China; 2. Orthopedics Department, the First Hospital of Lanzhou University, Gansu, Lanzhou 730000, China; 3. School of Materials Science and Engineering, Nanjing Institute of Technology, Jiangsu, Nanjing 211167, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of a new magnesium alloy on the biological characteristics of *Staphylococcus aureus*. **Methods** There were two groups, an experimental group (with new magnesium alloy) and a control group (without new magnesium alloy) in the experiment, each with 3 replicate wells. *Staphylococcus aureus* proliferation experiment, *Staphylococcus aureus* plasma coagulase experiment, *Staphylococcus aureus* hemolysin experiment, and antibiotic antibacterial ring experiment were conducted respectively, and statistical analysis was performed after the experiments. **Results** The results of bacterial proliferation experiments showed that at the same time point, the OD values of the experimental group with different concentrations were significantly lower than those of the control group, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). At different time points, the OD values of the experimental group at the same concentration were significantly lower than those of the control group ( $P < 0.05$ ). As the cultivation time prolonged, the difference in OD values between the experimental group and the control group at the same concentration gradually increased ( $P < 0.05$ ). The results of the *Staphylococcus aureus* plasma coagulase experiment showed that compared with the control group, the experimental group had smaller agglutination particles, and as the cultivation time prolonged, the agglutination particles gradually became smaller. The hemolysin test results of *Staphylococcus aureus* showed that compared with the control group, the  $\beta$ -hemolytic rings in the experimental group were relatively small and decreased with

[基金项目] 甘肃省兰州市科技计划项目(2021-1-79)。

▲通讯作者

culture time, and after 7 days of cultivation, the  $\beta$ -hemolytic rings disappeared. The results of the antibiotic antibacterial ring experiment showed that compared with the control group, all antibiotics in the experimental group had larger inhibition ring diameters at days 1, 3, 5, and 7, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Magnesium alloy has the ability to inhibit the proliferation of *Staphylococcus aureus*. At the same time, it also has impacts on its plasma coagulase, hemolysin, and antibiotic antibacterial properties.

**[Key words]** Magnesium alloy; *Staphylococcus aureus*; Biological characteristics; Biofilm

金黄色葡萄球菌是一种容易形成生物膜的革兰氏阳性球菌,在相关黏蛋白介导作用下,可定植、黏附于植入物,如心脏瓣膜、骨科植入物等表面形成生物膜,一旦发生植入物感染,往往需要取出植入物、扩大清创、延长抗生素使用时间,给临床治疗带来极大的挑战<sup>[1-4]</sup>。植入材料镁合金是一种可降解金属材料,具有良好的生物相容性及生物可降解性,镁合金降解后产生的 $\text{OH}^-$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 具有抗菌的作用,降低了细菌的活力,然而新型镁合金Mg-3Nd-1Gd-0.3Sr-0.2Zn-0.4Zr对金黄色葡萄球菌生物学特性的影响尚无研究报道,故本研究探讨新型镁合金Mg-3Nd-1Gd-0.3Sr-0.2Zn-0.4Zr对金黄色葡萄球菌生物学特性的影响,从而为镁合金抑制金黄色葡萄球菌生物学行为提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新型Mg-3Nd-1Gd-0.3Sr-0.2Zn-0.4Zr合金材料由南京工程学院提供。金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC25923)由甘肃省第二人民医院检验科提供。

### 1.2 主要仪器

赛默飞MK3酶标仪(上海蓓米尔生物科技有限公司);DHP-9602 35℃恒温培养箱(上海左乐仪器有限公司);LMQ.C-80E高压蒸汽灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);BSC-3FA2鑫贝西生物安全柜(山东博科生物产业有限公司);ATB-new微生物鉴定及药敏分析仪(法国梅里埃生物有限公司);单槽超声波清洗机(陕西凯德力环保科技有限公司)。

### 1.3 镁合金试样制备

将新型Mg-3Nd-1Gd-0.3Sr-0.2Zn-0.4Zr合金制成10 mm×3 mm圆柱状试样,用无菌去离子水冲洗干净,高压灭菌后备用。

### 1.4 金黄色葡萄球菌悬液制备

将金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC25923)干粉接种于哥伦比亚血琼脂平板,放入37℃恒温培养箱中培养18 h。挑取分纯好的单个金黄色葡萄球菌菌落分别配置0.5、0.6、0.7、0.8、0.9麦氏浊度菌悬液各18 ml。分别相当于 $1.5 \times 10^8$ 、 $1.8 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $2.4 \times 10^8$ 、 $2.7 \times 10^8$  CFU/ml。

### 1.5 金黄色葡萄球菌增殖实验

实验分为实验组及对照组,各设3个复孔。实验组分别各吸取不同浓度金黄色葡萄球菌悬液3 ml加入含有镁合金试样的24孔培养板中;对照组分别将3 ml不同浓度金黄色葡萄球菌悬液加入不含有镁合金试样的24孔培养板。将培养板放入37℃恒温箱中培养1、3、5、7 d,取出培养板,用无菌枪将菌悬液吹打混匀,每孔吸取100  $\mu\text{l}$ 菌悬液转移至酶标仪中,在450 nm处读取各组菌悬液OD值。

### 1.6 金黄色葡萄球菌血浆凝固酶实验、溶血素实验、抗生素抑菌环实验

实验分为实验组(新型镁合金)及对照组(不含新型镁合金),各设3个复孔。实验组吸取金黄色葡萄球菌悬液3 ml加入含有镁合金试样的无菌玻璃试管中;对照组将3 ml金黄色葡萄球菌悬液加入不含有镁合金试样的无菌玻璃试管中。将试管放入37℃恒温箱中静置培养1、3、5、7 d,取出试管,将金黄色葡萄球菌菌悬液转种到哥伦比亚血琼脂平板,挑取单个菌落分别进行金黄色葡萄球菌血浆凝固酶实验、溶血素实验、抗生素抑菌环实验。

### 1.7 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件对数据进行处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,行 $t$ 检验,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 金黄色葡萄球菌增殖实验

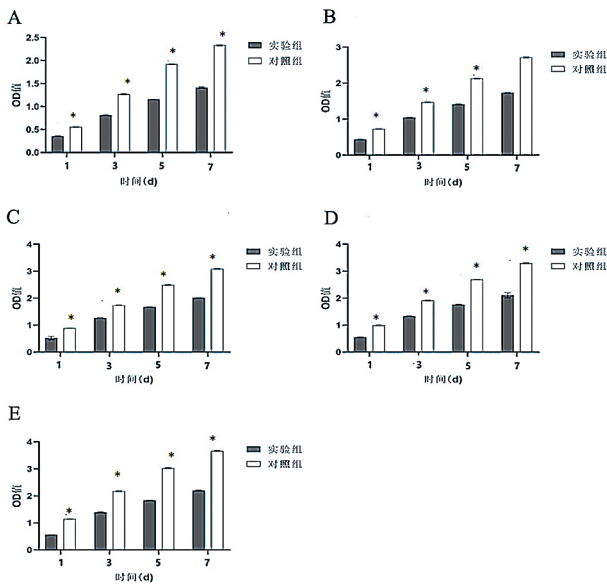
在同一时间点,不同浓度实验组OD值比对照组明显更低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表1)。在不同时间点,相同浓度实验组与对照组比较,OD值明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图1)。随着培养时间延长,相同浓度实验组与对照组OD值之差逐渐上升( $P < 0.05$ )(图2)。

### 2.2 金黄色葡萄球菌血浆凝固酶实验

与对照组比较,实验组凝集颗粒较小,且随着培养时间延长,凝集颗粒逐渐变小(图3)。

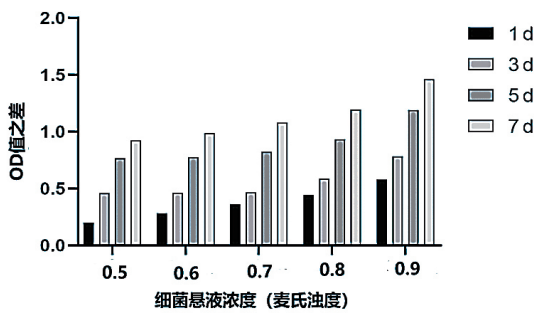
表1 两组金黄色葡萄球菌增殖情况 (OD值) ( $\bar{x} \pm s$ )

浊度	1 d		3 d		5 d		7 d	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
0.5	0.354 ± 0.008	0.554 ± 0.005	0.809 ± 0.005	1.269 ± 0.012	1.153 ± 0.005	1.919 ± 0.005	1.412 ± 0.016	2.334 ± 0.010
0.6	0.433 ± 0.003	0.726 ± 0.007	1.005 ± 0.004	1.468 ± 0.005	1.356 ± 0.005	2.131 ± 0.011	1.731 ± 0.004	2.719 ± 0.015
0.7	0.519 ± 0.065	0.884 ± 0.004	1.270 ± 0.005	1.735 ± 0.006	1.673 ± 0.008	2.496 ± 0.013	2.012 ± 0.006	3.092 ± 0.006
0.8	0.551 ± 0.003	0.993 ± 0.006	1.328 ± 0.007	1.916 ± 0.006	1.759 ± 0.005	2.691 ± 0.006	2.105 ± 0.093	3.299 ± 0.016
0.9	0.563 ± 0.003	1.142 ± 0.007	1.395 ± 0.012	2.178 ± 0.008	1.834 ± 0.006	3.027 ± 0.011	2.202 ± 0.017	3.665 ± 0.012



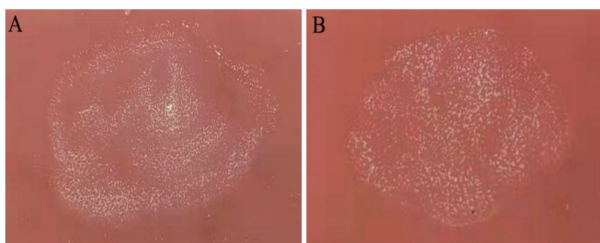
注 A: 0.5 麦氏浊度组; B: 0.6 麦氏浊度组;  
C: 0.7 麦氏浊度组; D: 0.8 麦氏浊度组;  
E: 0.9 麦氏浊度组细菌增殖; 与对照组比较  $P < 0.05$

图1 金黄色葡萄球菌增殖实验



注 随着培养时间延长, 相同浓度实验组与对照组 OD 值之差逐渐上升

图2 金黄色葡萄球菌增殖实验

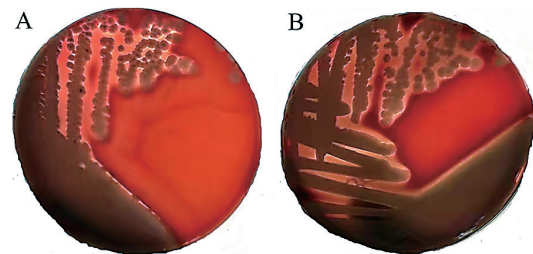


注 A: 实验组; B: 对照组

图3 金黄色葡萄球菌血浆凝固酶实验 (光镜, 40×)

### 2.3 金黄色葡萄球菌溶血素实验

与对照组比较, 实验组  $\beta$  溶血环较小, 且随着培养时间延长,  $\beta$  溶血环逐渐减弱, 而且培养 7 d 后,  $\beta$  溶血环消失 (图 4)。

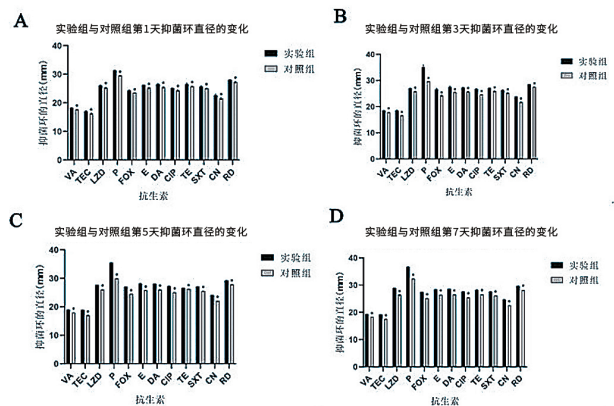


注 A: 实验组溶血环; B: 对照组溶血环

图4 金黄色葡萄球菌溶血素实验 (光镜, 40×)

### 2.4 抗生素抑菌环实验

与对照组比较, 实验组所有抗生素在 1、3、5、7 d 抑菌环直径较大, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。



注 A: 第 1 天; B: 第 3 天; C: 第 5 天; D: 第 7 天; VA: 万古霉素; TEC: 替考拉宁; LZD: 利奈唑胺; P: 青霉素; FOX: 头孢西丁; E: 红霉素; DA: 克林霉素; CIP: 环丙沙星; TE: 四环素; SXT: 复方新诺明; CN: 庆大霉素; RD: 利福平

图5 抗生素抑菌环实验

## 3 讨论

植入物感染诊治困难在于植入材料表面细菌生物膜的形成<sup>[5-8]</sup>, 金黄色葡萄球菌在相关黏蛋白介导下, 可定植、黏附于植入物表面, 形成细菌生物膜<sup>[9-11]</sup>。

近年来,本研究课题组对系列镁合金进行研究,结果表明镁合金材料对成骨细胞具有良好的细胞相容性,对骨组织具有良好的组织相容性,对机体重要脏器具有良好的生物安全性<sup>[12-18]</sup>,Robinson等<sup>[19-20]</sup>研究表明镁合金在人体环境中降解后可杀死大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等常见细菌。本研究首先探讨镁合金对金黄色葡萄球菌增殖的影响,研究结果显示在同一时间点不同浓度实验组 OD 值比对照组明显更低;在不同时间点相同浓度实验组与对照组比较,OD 值明显降低;随着培养时间延长,相同浓度实验组与对照组 OD 值之差逐渐上升,结果表明镁合金具有抑制金黄色葡萄球菌增殖的能力;随着细菌浓度的增加,镁合金抑制细菌增殖的能力也逐渐增加。研究结果还显示相同浓度对照组与实验组 OD 值之差在第 5 天之后逐渐减低,表明细菌的增殖能力逐渐降低。随后本研究探讨了镁合金对金黄色葡萄球菌血浆凝固酶、菌溶血素、抗生素抑菌等生物学特性的影响,研究结果显示随着培养时间延长,血浆凝固酶实验凝集颗粒逐渐变小;葡萄球菌溶血素( $\beta$  溶血环)逐渐减小;各抗生素抑菌环直径逐渐增大,结果表明镁合金对金黄色葡萄球菌的生物学特性有明显的影。

综上所述,新型 Mg-3Nd-1Gd-0.3Sr-0.2Zn-0.4Zr 合金具有抑制金黄色葡萄球菌增殖的能力;同时,镁合金还能抑制金黄色葡萄球菌血浆凝固酶凝集颗粒及  $\beta$  溶血环,增强抗生素抑菌环等生物学特性。

#### [参考文献]

- 杜仲业.金黄色葡萄球菌生物被膜相关感染研究进展[J].黑龙江科学,2021,12(14):40-41.
- She P, Liu Y, Wang Y, et al. Antibiofilm efficacy of the gold compound auranofin on dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* sp[J]. J Appl Microbiol, 2020, 128(1): 88-101.
- 李新圃, 罗金印, 武小虎, 等. 金黄色葡萄球菌生物膜形成及调控机制研究进展[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(10): 2069-2075.
- Frassinetti S, Falleni A, Del Carratore R. Effect of itraconazole on *Staphylococcus aureus* biofilm and extracellular vesicles formation[J]. Microb Pathog, 2020, 147: 104267.
- Shirai T, Shimizu T, Ohtani K, et al. Antibacterial iodine-supported titanium implants[J]. Acta Biomater, 2011, 7(4): 1928-1933.
- 黄艺聪, 周盟. 可降解生物医用金属在骨折内固定修复应用的研究进展[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2021, 14(9): 811-816.
- 李新圃, 王胜义, 杨峰. 金黄色葡萄球菌生物膜感染机制及药物作用研究进展[J]. 动物医学进展, 2020, 41(4): 99-103.
- 郑杨, 查何. 金黄色葡萄球菌生物膜防治研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(18): 32-35.
- Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, et al. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2018, 261: 1-14.
- Winkler H, Haiden P. Allograft bone as antibiotic carrier[J]. J Bone Jt Infect, 2017, 2(1): 52-62.
- Valle J, Echeverz M, Lasa I.  $\sigma$  B Inhibits Poly-N-Acetylglucosamine exopolysaccharide synthesis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 2019, 201(11): e00098-19.
- 王勇平, 张怀斌, 梁文强, 等. 可降解镁合金接骨板体内降解行为及力学性能[J]. 医用生物力学, 2021, 36(6): 935-939.
- 王勇平, 梁文强, 谢亚东, 等. 可降解镁合金接骨板修复新西兰兔胫骨骨折的实验研究[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(11): 2027-2030.
- Wang Y, Liang W, Liu X, et al. Osteogenesis and degradation behavior of magnesium alloy plate in vivo[J]. European Journal of Inflammation, 2021, 19: 1-9.
- Wang Y, Zhu Z, He Y, et al. In vivo degradation behavior and biocompatibility of Mg-Nd-Zn-Zr alloy at early stage[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(2): 178-184.
- 王勇平, 刘小荣, 张炳春, 等. 镁合金支架对成骨细胞功能的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(34): 5021-5026.
- Wang Y, He Y, Zhu Z, et al. In vitro degradation and biocompatibility of Mg-Nd-Zn-Zr alloy[J]. Chin Sci Bull, 2012, 57(17): 2163-2170.
- 王勇平, 何耀华, 朱兆金, 等. Mg-Nd-Zn-Zr 镁合金体外降解行为及生物相容性[J]. 科学通报, 2012, 57(32): 3109-3116.
- Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data[J]. Genome Biol, 2010, 11(3): R25.
- Ren X, Wang L, Chen W. Oxytropis glabra DC inhibits biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* by down-regulating ica operon expression[J]. Curr Microbiol, 2020, 77(7): 1167-1173.

(收稿日期: 2023-06-30)