

铁离子对隐形眼镜上铜绿假单胞菌生物膜形成的影响

王砚颖¹, 廖素华², 张书楠¹

基金项目: 深圳市科技计划基金项目 (No. 201002131)

作者单位:¹ (518000) 中国广东省深圳市中医院眼科;

² (518000) 中国广东省深圳市, 北京大学深圳医院眼科

作者简介: 王砚颖, 女, 主治医师, 研究方向: 中西医结合眼科。

通讯作者: 廖素华, 女, 主任医师, 研究方向: 中西医结合眼科。

1050219782@qq.com

收稿日期: 2012-07-30 修回日期: 2012-11-20

Influence of iron ion on the formation of pseudomonas aeruginosa biofilm on the contact lens

Yan-Ying Wang¹, Su-Hua Liao², Shu-Nan Zhang¹

Foundation item: Shenzhen Science and Technology Plan Project, China (No. 201002131)

¹Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; ²Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Su-Hua Liao. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China. 1050219782@qq.com

Received: 2012-07-30 Accepted: 2012-11-20

Abstract

• **AIM:** To observe the influence of free iron, synthetic or biological iron chelating agent on the formation of pseudomonas aeruginosa biofilm on the contact lenses.

• **METHODS:** Different concentration of free iron, different concentration and variety classes of synthesis iron and biological iron chelating agent were added into pseudomonas aeruginosa biofilm, and then the clump count on the biofilm was detected.

• **RESULTS:** Low concentration of free iron increased the adhesive capacity of the bacterial, with 10 μmol/L of iron had the most obvious effect. 0.1 μmol/L of EDTA and lactoferrin significantly inhibited the bacterial count of pseudomonas aeruginosa biofilm.

• **CONCLUSION:** Low concentration of free iron can promote the bacterial count of pseudomonas aeruginosa biofilm on the contact lens, the lack iron circumstance which formed by finite concentration lactoferrin and EDTA can prevent the formation of the biofilm.

• **KEYWORDS:** pseudomonas aeruginosa; biofilm; contact lens; iron ion

Citation: Wang YY, Liao SH, Zhang SN. Influence of iron ion on the formation of pseudomonas aeruginosa biofilm on the contact lens. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(12):2276-2279

摘要

目的: 观察游离铁、合成或生物铁螯合剂对隐形眼镜铜绿假单胞菌生物膜形成的影响。

方法: 铜绿假单胞菌生物膜中加入不同浓度的游离铁、不同浓度及不同种类的合成铁和螯合铁条件下定量检测生物膜上的菌落数。

结果: 低浓度游离铁离子的作用可以增强细菌的黏附量, 以 10 μmol/L 铁离子的作用最明显。0.1 μmol/L EDTA 和乳铁蛋白可明显抑制铜绿假单胞菌生物膜的菌数。

结论: 低浓度游离铁离子的作用可以促进隐形眼镜铜绿假单胞菌生物膜形成, 而一定浓度的乳铁蛋白及 EDTA 形成的缺铁情况下可阻止该生物膜的形成。

关键词: 铜绿假单胞菌; 生物膜; 隐形眼镜; 铁离子

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2012.12.08

引用: 王砚颖, 廖素华, 张书楠. 铁离子对隐形眼镜上铜绿假单胞菌生物膜形成的影响. *国际眼科杂志* 2012;12(12):2276-2279

0 引言

当今在全球有 1.25 ~ 1.40 亿隐形眼镜的配戴者^[1,2], 其中, 在全球市场中以使用硅水凝胶镜片作为延长配戴时间的主要隐形眼镜镜片类型^[3]。然而, 这些高分子材料的引入也没有解决由其导致的眼部感染和炎症问题, 细菌性角膜炎的发病率并没有改变^[4-6]。铜绿假单胞菌是配戴隐形眼镜引起细菌性角膜炎的主要致病菌^[7,8], 该菌有附着隐形眼镜并随后形成生物膜 (biofilm, BF) 的能力, 该生物膜延长了病原体与眼睛的表面接触, 提高了其致病性。因此, 研究预防和延迟铜绿假单胞菌形成生物膜策略是非常迫切的。近年来, 研究发现铁离子在铜绿假单胞菌 BF 的形成过程中起到至关重要的作用, 铁是微生物生长必需的微量元素之一, 细胞内许多的蛋白质都是含铁蛋白质。本课题主要研究使用不同浓度的游离铁、不同浓度的合成或生物铁螯合剂对隐形眼镜铜绿假单胞菌生物膜形成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 实验菌株为铜绿假单胞菌 (ATCC 9027), 由中国医学菌种保藏中心提供。主要试剂: Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (广州化学试剂厂); 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB, 广东环凯微生物科技有限公司); MH 培养基 (OXID)。激光扫描共聚焦显微镜 (Randianee2100, Biorad, 美国), 比浊仪 (法国 bioMerieux 公司), 12 孔细胞培养板 (美国 Costar 公司)。

1.2 方法

1.2.1 铜绿假单胞菌生物膜形成模型的构建 硅水凝胶镜片经 PBS 冲洗后, 放置于每孔含 4mL 铜绿假单胞菌悬液的 12 孔细胞培养板中 37℃ 培养 2h, 当镜片黏附有铜绿假单胞菌 (黏附期) 时, 取出这些黏附细菌的镜片经

表 1 硅水凝胶镜片上铜绿假单胞菌各时间组细菌黏附结果

黏附时间(h)	0	2	6	20	24
黏附菌数(cfu/片)	9.20×10^5	3.10×10^6	1.73×10^7	1.74×10^7	1.70×10^7

表 2 硅水凝胶镜片上铜绿假单胞菌加入不同浓度游离铁后细菌黏附结果

游离铁浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	1	10	100	1000
黏附菌数(cfu/片)	1.81×10^6	3.20×10^6 ^a	5.40×10^6	3.35×10^6	1.27×10^6

^a $P < 0.05$ vs 0, $10 \mu\text{mol/L}$ 组。

表 3 加入不同浓度合成剂 EDTA 后细菌黏附结果

EDTA 浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	0.1	0.5	2.5
黏附菌数(cfu/片)	2.46×10^6	1.64×10^6	1.91×10^6	2.55×10^6

表 4 加入不同浓度整合剂乳铁蛋白后细菌黏附结果

乳铁蛋白浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	0.1	0.5	2.5
黏附菌数(cfu/片)	2.46×10^6	1.02×10^6	1.83×10^6	2.49×10^6

表 5 正常状态、缺铁环境和部分缺铁环境下铜绿假单胞菌生物膜生长情况

分组	正常状态	0.1 $\mu\text{mol/L}$ EDTA	0.1 $\mu\text{mol/L}$ 乳铁	0.1 $\mu\text{mol/L}$ EDTA + 10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3	0.1 $\mu\text{mol/L}$ 乳铁蛋白 + 10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3
黏附菌数(cfu/片)	1.88×10^6	5.80×10^5	4.50×10^5	1.25×10^6	7.80×10^5

PBS 冲洗后,放置含 1% TSB 液体培养基于摇床中 120r/min, 37°C 培养 0, 2, 6, 20, 24h。用 PBS 洗下细菌生物膜转移到 1.5mL 离心管中进行定量检测,生物膜经超声波 5min 振荡后,用 PBS 连续稀释接种在 MH 琼脂平板上,37°C 培养 24h 计数菌落数。

1.2.2 不同浓度的游离铁 FeCl_3 对生物膜的影响 将上述生物膜形成模型建立方法的 TSB 液体培养基中分别加入 0, 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 , 在 37°C 摇床中培养 24h, 定量检测菌落数。

1.2.3 不同浓度及不同种类的合成铁和生物铁整合剂对生物膜的影响 将上述生物膜形成模型建立方法的 TSB 液体培养基中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 , 再分别加入 0.1, 0.5, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的合成铁整合剂 EDTA 和生物铁整合剂乳铁蛋白, 在 37°C 摇床中培养 24h, 定量检测生物膜上菌落数。

1.2.4 正常状态、缺铁环境和部分缺铁环境下铜绿假单胞菌生物膜生长情况 将上述生物膜形成模型建立方法的 TSB 液体培养基中不加任何试剂(正常状态)、加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 合成铁整合剂 EDTA(缺铁环境)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 生物铁整合剂乳铁蛋白(缺铁环境)、10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 合成铁整合剂 EDTA(部分缺铁环境)、10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 生物铁整合剂乳铁蛋白(部分缺铁环境), 在 37°C 摇床中培养 24h, 定量检测生物膜上的菌落数。

1.2.5 扫描电镜观察隐形眼镜上的铜绿假单胞菌生物膜 铜绿假单胞菌在隐形眼镜上形成生物膜后,进行标本观察前处理:(1)2% 戊二醛固定 40min;(2)1% 四氧化钨泡 90min;(3)0.1mol/L PBS 漂洗 10min;(4)1% 单宁酸浸泡 30min \times 2 次;(5)500mL/L 乙醇浸泡 30min \times 2 次;(6)700mL/L 乙醇浸泡 30min 后,浸于 700mL/L 乙醇过夜;(7)700mL/L 乙醇浸泡 30min;(8)900mL/L 乙醇浸泡 30min \times 2 次;(9)1000mL/L 乙醇浸泡 30min \times 2 次;(10)醋酸异戊酯浸泡过夜;(11)临界点干燥;(12)离子溅射镀膜。

1.2.6 激光共聚焦扫描显微镜观察隐形眼镜上的铜绿假单胞菌生物膜 将生长有铜绿假单胞菌生物膜的隐形眼镜转移到含荧光染色剂的 12 孔细胞培养板中,在与染料孵化后,放置在一个 35mm 直径的玻璃培养皿中,在激光共聚焦扫描显微镜(CSLM)下观察。每个生物膜标本逐层扫描,通过随机附带的专业软件处理,得到生物膜的断层扫描图像。

2 结果

2.1 不同时间铜绿假单胞菌黏附结果 由表 1 可见,硅水凝胶镜片上的铜绿假单胞菌在 TSB 液体培养基中培养 20h 后细菌的黏附数量最多,培养 20~24h 细菌的黏附数量基本稳定,不再变化。

2.2 加入不同游离铁 FeCl_3 浓度后各组生物膜上的细菌黏附结果 由表 2 可见,低浓度游离铁离子的作用可以增强细菌的黏附量,10 $\mu\text{mol/L}$ 铁离子的作用最明显,游离铁离子浓度超过 100 $\mu\text{mol/L}$ 后,反而抑制细菌的黏附和生物膜形成。

2.3 加入不同浓度的铁合成剂和铁整合剂后生物膜上的细菌黏附结果 由表 3,4 可见,加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 EDTA 和乳铁蛋白后可明显抑制铜绿假单胞菌生物膜的菌数,但 EDTA 和乳铁蛋白浓度达到 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 后,生物膜上的菌数反而增加。

2.4 正常状态、缺铁环境和部分缺铁环境下铜绿假单胞菌生物膜生长情况 由表 5 可见,缺铁环境下铜绿假单胞菌生物膜菌数明显降低,加入游离铁形成部分缺铁环境后,生物膜菌数较缺铁环境下显著增加。

2.5 扫描电镜观察正常状态、缺铁环境和部分缺铁环境下铜绿假单胞菌生物膜的微观形态 正常状态可见铜绿假单胞菌呈短杆状,聚集成团,为浓厚的黏液样物质紧密包裹,生物膜形态完整。在 EDTA 造成的缺铁状态下,铜绿假单胞菌只能形成散在小菌团;且在缺铁条件下加入少量铁离子后仍存在散在单个菌落,但菌团数量明显增加(图 1)。在乳铁蛋白造成的缺铁环境下,形成的菌团小且



图1 不同浓度铁离子下铜绿假单胞菌生物膜的微观形态($\times 3500$) A:正常环境;B:缺铁环境(加入 $0.1\mu\text{mol/L}$ EDTA);C:部分缺铁环境($0.1\mu\text{mol/L}$ EDTA+ $10\mu\text{mol/L}$ FeCl_3)。

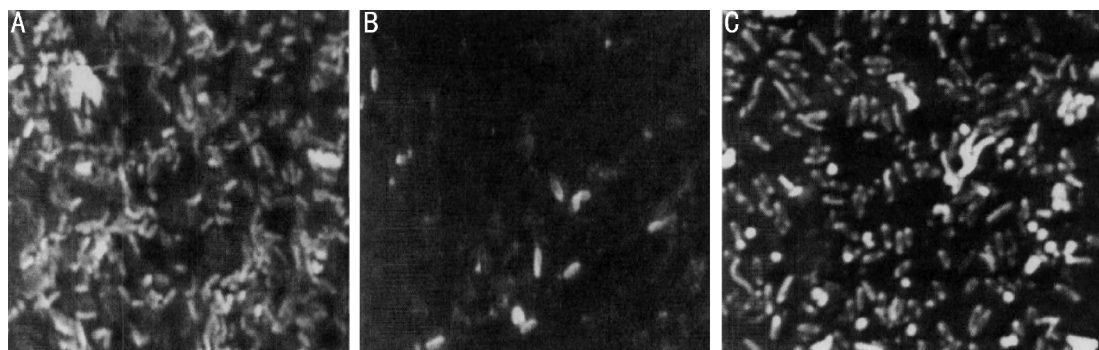


图2 不同浓度铁离子下铜绿假单胞菌生物膜的微观形态($\times 3500$) A:正常环境;B:缺铁环境(加入 $0.1\mu\text{mol/L}$ 乳铁蛋白);C:部分缺铁环境($0.1\mu\text{mol/L}$ 乳铁蛋白+ $10\mu\text{mol/L}$ FeCl_3)。

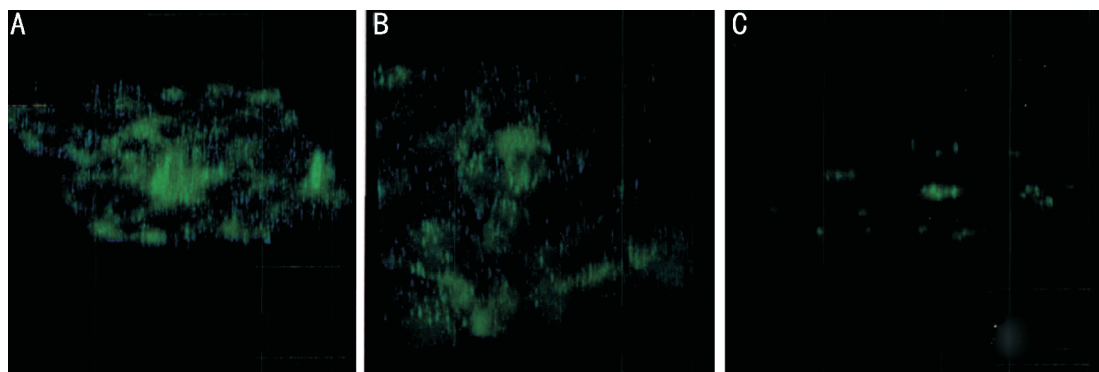


图3 不同浓度铁离子下铜绿假单胞菌生物膜的微观形态 A:正常环境;B:部分缺铁环境($0.1\mu\text{mol/L}$ EDTA+ $10\mu\text{mol/L}$ FeCl_3);C:缺铁环境(加入 $0.1\mu\text{mol/L}$ EDTA)。

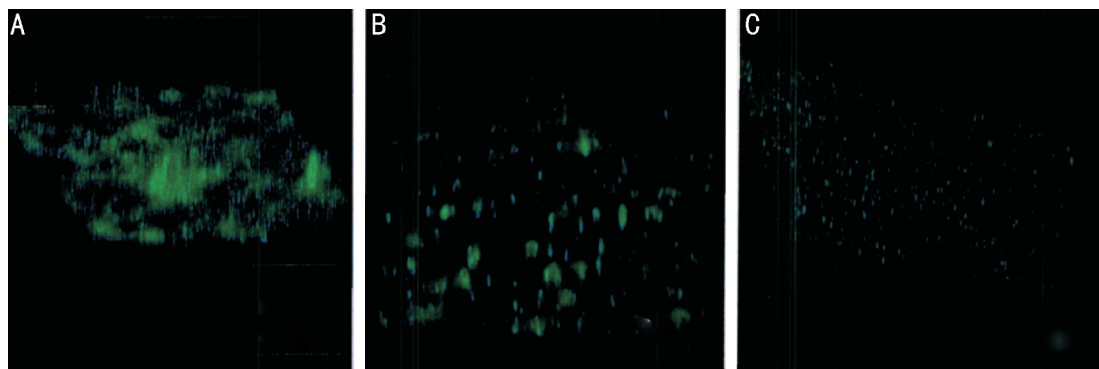


图4 不同浓度铁离子下铜绿假单胞菌生物膜的微观形态 A:正常环境;B:部分缺铁环境($0.1\mu\text{mol/L}$ 乳铁蛋白+ $10\mu\text{mol/L}$ FeCl_3);C:缺铁环境(加入 $0.1\mu\text{mol/L}$ 乳铁蛋白)。

稀疏,仅有单个菌体附在硅胶膜表面,连菌团也未能形成(图2)。

2.6 激光共聚焦扫描显微镜观察铁离子对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响 如图3,CSLM 三维成像结果显示,经过24h 培养后,正常环境中铜绿假单胞菌形成多数大块状隆起(图中绿色为存活的细菌发出的绿色荧光),为成熟

的被膜形态(图3A);在 EDTA 造成的缺铁状态下,不但黏附的绿色物质明显减少,隆起的厚度也显著的降低(图3C)。铜绿假单胞菌在铁离子浓度回升时,显示出被膜形成增多的趋势(图3B,4B)。在乳铁蛋白造成的缺铁环境下,菌落数量急剧减少,几乎成点状分布(图4C)。

3 讨论

3.1 铁离子对隐形眼镜上铜绿假单胞菌生物膜形成的影响 研究发现,铁离子在铜绿假单胞菌生物膜的形成过程中起到至关重要的作用,铁是微生物生长必需的微量元素之一,观察加入不同游离铁 FeCl_3 浓度后各组生物膜上的细菌黏附结果发现,低浓度游离铁离子的作用可以增强细菌的黏附量,以 $10\mu\text{mol/L}$ 铁离子的作用最明显,说明在 $10\mu\text{mol/L}$ 铁离子的作用下最有助于铜绿假单胞菌生物膜的形成。

3.2 合成铁和生物铁螯合剂对隐形眼镜上铜绿假单胞菌生物膜的影响 将铜绿假单胞菌生物膜形成模型建立方法的 TSB 液体培养基中加入 $10\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 ,再分别加入 0.1 , $0.5\mu\text{mol/L}$ 和 $2.5\mu\text{mol/L}$ 的合成铁螯合剂 EDTA 和生物铁螯合剂乳铁蛋白,在 37°C 摇床中培养 24h,定量检测生物膜上菌落数。观察发现乳铁蛋白及 EDTA 能阻止铜绿假单胞菌生物膜的形成,加入 $0.1\mu\text{mol/L}$ 的 EDTA 和乳铁蛋白后可明显抑制铜绿假单胞菌生物膜的菌数,但 EDTA 和乳铁蛋白浓度达到 $0.5\mu\text{mol/L}$ 后,生物膜上的菌数反而增加,提示在一定浓度下乳铁蛋白及 EDTA 通过对游离铁的多价螯合作用可阻止生物膜的形成。

3.3 正常状态、缺铁环境和部分缺铁环境下对铜绿假单胞菌生物膜生长的影响 观察正常状态、缺铁环境和部分缺铁环境下铜绿假单胞菌生物膜的生长情况,发现缺铁环境下铜绿假单胞菌生物膜菌数明显降低,加入游离铁形成部分缺铁环境后,生物膜菌数较缺铁环境下显著增加。说明在造成缺铁的情况下,可以明显减少铜绿假单胞菌生物膜

菌数。

综上所述,通过研究游离铁及合成或生物铁螯合剂对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响,可以探索预防隐形眼镜上该生物膜形成的方法,寻找更加有效的方法来消灭已经形成的生物膜病原体,减少使用隐形眼镜后造成的眼部感染,让人们能够更加安全地使用隐形眼镜。

参考文献

- 1 Key JE. Development of contact lenses and their worldwide use. *Eye Contact Lens* 2007;33:343-345
- 2 Stapleton F, Keay L, Jalbert I, et al. The epidemiology of contact lens related infiltrates. *Optom Vis Sci* 2007;84:257-272
- 3 Woods CA, Jones DA, Jones LW, et al. A seven year survey of the contact lens prescribing habits of Canadian optometrists. *Optom Vis Sci* 2007;84:505-510
- 4 Poggio EC, Glynn RJ, Schein OD, et al. The incidence of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. *N Engl J Med* 1989;321:779-783
- 5 Stapleton F, Keay L, Edwards K, et al. The incidence of contact lens-related microbial keratitis in Australia. *Ophthalmology* 2008;115:1655-1662
- 6 Szczołka-Flynn L, Diaz-Insua M. Risk of corneal inflammatory events with silicone hydrogel and low Dk hydrogel extended contact lens wear; a meta-analysis. *Optom Vis Sci* 2007;125:1-5
- 7 Kodjikian L, Casoli-Bergeron E, Malet F, et al. Bacterial adhesion to conventional hydrogel and new silicone-hydrogel contact lens materials. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246:267-273
- 8 Dang YN, Rao A, Kastl PR, et al. Quantifying *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to contact lenses. *Eye Contact Lens* 2003;29:65-68