文章编号:1000-5404(2009)09-0797-05

论著

人羊膜匀浆上清液的体外抗菌特性研究

王 欣,谢汉平,刘 静 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 研究人羊膜匀浆上清液的体外抗菌特性。**方法** 取新鲜人羊膜制备匀浆上清液及"去上皮"羊膜,琼脂扩散法研究其抗菌作用及抗菌谱,微量肉汤稀释法比较其与青霉素等 10 种眼科临床常用抗生素的抗菌作用强弱,研究 pH 值、温度、时间对抗菌活性的影响,透射电镜观察其抗菌作用的可能靶点。**结果** 羊膜中含有抗菌成分,存在于羊膜上皮细胞中;羊膜匀浆上清液抗菌谱广,其抑菌活性强于氯霉素、磺胺和头孢呋辛钠,与克林霉素和妥布霉素相当,杀菌活性不低于所选的 10 种抗生素;其性质稳定;抗菌作用靶点可能为病原微生物质膜。**结论** 羊膜匀浆上清液有望成为治疗眼部感染的一种方便有效的方法,羊膜移植用于眼表重建时应采用带有完整上皮层的新鲜羊膜。

关键词: 羊膜匀浆;抗菌肽;最小抑菌浓度
中图法分类号: R318.08; R779.6 **文献标识码:** A

Antimicrobial properties of human amniotic homogenate supernatant *in vitro*

WANG Xin, XIE Han-ping, LIU Jing (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the antimicrobial properties of human amniotic homogenate supernatant (HAHS) in order to found a theoretical base for the use of human amniotic membrane in ophthalmological field. Methods Fresh human amniotic membranes were used to make HAHS and acellular amniotic membranes. Then, we observed their antimicrobial effects and antimicrobial spectrums, compared the antimicrobial capacity with 10 commonly used antibiotics in eyes, and investigated the effects of time, temperature and pH value on the antimicrobial capacity. Finally, transmission electron microscopy (TEM) was used to explore the possible targeting site of the antibiosis. Results Human amnion membrane contained antimicrobial components locating in its epithelial cells. HAHS had a broad antimicrobial spectrum and was steady in nature. Its antimicrobial capacity was stronger than those of sulfasulfonamide, chloromycetin and cefuroxime sodium. TEM indicated that the antimicrobial effect were exerted through plasma membrane of microorganism. Conclusion HAHS can be an effective and convenient treatment for ocular surface infectious diseases. Traditional amnion transplantation should employ fresh human amniotic membranes containing complete epithelial lamina to reconstruct the ocular surface.

Key words: amniotic homogenate; antimicrobial peptides; minimal inhibitory concentration

羊膜是一种来源方便、取材容易和价格便宜的生物材料,单纯的人羊膜抗原性极低,羊膜移植已成为当今眼表手术的一个热点。其主要临床作用有加速上皮化,维持正常上皮表型,减轻炎症反应,减轻血管化,减少瘢痕形成等[1]。其可能的作用机制也逐渐被人们研究和认识。羊水的抗菌特性已被很好的证实[2],但关于羊膜是否具有抗微生物特性说法不一[3-5]。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是生物防御系统产生的一类对抗外源性病原体的小分子肽类物质,是天然免疫的重要防御物质。抗菌肽分布极为广泛,几乎所有的生物种属中均有发现[6]。20 世纪 80 年代初被首次发现,至今已经分离出千余种抗菌肽[7]。人源性抗菌肽主要由防御素(human beta defensin, HBD)、cathelicidins 和 histatin 3 类组成,主要存在于中性粒细胞及皮肤和黏膜的上皮细胞。由于传统抗生素的耐药性问题日趋严重,所以目前抗菌肽的药用开发已成为研究热点。2007 年,King 等[8]报道在人胎盘、胎膜和胎盘的绒毛膜滋养层以及羊膜上皮和蜕膜上都有 HBD1 ~ HBD3 的表达,同时还发现在体外培养的初级滋养层细胞中,HBD2 mRNA 表达会随炎症细胞因子 IL-1β 的诱导而上调。2007 年 Stock 等[9]也证实原代培养的羊膜上皮细胞中存在着 HBD1 ~ HBD3 mRNA 和蛋白的表达,并认为羊膜生成较强有力的自然抗菌物质可能用于防止妊娠感染,其中 HBD2 会随妊娠相关的炎症细胞因子 IL-1β 的诱导大

作者简介:王 欣,女,湖北省襄樊市人,硕士研究生,医师,主要从事角膜病防治方面的研究。电话:(023)68754403,E-mail:leyawala@163.com
通信作者:谢汉平,电话:(023)68765377, E-mail: xiehanping@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2008-11-21;修回日期:2008-12-12

量上调。本实验拟对人羊膜匀浆上清液(human amniotic homogenate supernatant, HAHS)的抗菌特性进行研究,以期对临床羊膜移植手术的移植材料、手术适应证的选择有所指导,探索一种新的治疗眼部感染的方便有效的手段。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、药品及设备

Mueller-Hinton(MH)肉汤(北京陆桥),7 mm 哥伦比亚血平板(重庆庞通),PDA 培养基(自制),胰酶粉剂、EDTA 粉剂(Sigma),DME/Ham's F_{12} 粉剂(美国 HyClone),BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce),青霉素等 10 种抗生素标准品(中国药品生物制品检定所),96 孔培养板(COSTAR),ZS83-1 型内切式匀浆机(浙江机械厂),JY92-Ⅱ超声波细胞粉碎机(上海新芝生物技术研究所),酶标仪和核酸蛋白仪 SmartSpec3000(美国 Bio-Rad),空气摇床(美国 Thermo Forma),5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf)。

1.2 菌株

3 个标准菌株:金黄色葡萄球菌(*StapHylococcus aureus*)ATCC(america type culture collection,美国标准菌库)25923、大肠埃希菌(*Escherichia coli.*)ATCC25922、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)ATCC27853,由第三军医大学复合伤研究所提供;4 个临床分离敏感菌株:肺炎链球菌(*Streptococcus Pneumoniae*)、表皮葡萄球菌(*StapHylococcus epidermidis*)、溶血葡萄球菌(*StapHylococcus haemolyticus*),奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*);4 个临床分离多重耐药菌株:粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、阴沟杆菌(*Enterobacter cloacae*)、大肠杆菌、耐甲氧西林金葡菌(*Methicillin-resistant StapHylococcus aureus*, MRSA),均由解放军 324 医院检验科提供,已经过生化鉴定,并具有药敏实验结果;3 个临床分离真菌菌株:白色念珠菌(*Blastomyces albicans*)、茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*),由第三军医大学西南医院皮肤科真菌室提供。

1.3 新鲜羊膜的取材和"去上皮"羊膜的制备

参考文献[3]的方法和纳入标准从健康产妇的胎盘组织上获取新鲜羊膜。按照 Meller 等[10]的方法制备"去上皮"羊膜,在新鲜羊膜中加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.06% EDTA 的混合消化液,37 ℃温箱消化 15 min,用细胞刮刀刮去残留的上皮细胞,倒置显微镜下检查无上皮细胞残留,所取羊膜干净未连带绒毛膜组织,并随机取刮去上皮的羊膜,用 4% 福尔马林固定后石蜡切片,HE 染色,光镜下验证上皮细胞已刮除干净。

1.4 HAHS 的制备

将刚取回的新鲜羊膜用 4 ℃ 0.01 mol/L PBS 液漂洗 3 次,称取羊膜湿质量,将羊膜剪成碎片,加入 1∶1的 0.01 mol/L PBS 液后进行匀浆(无菌冰浴条件下 5 000 r/min, 30 s,10 个冲程),匀浆完毕后按 1∶2加 PBS 液于 20 ml 离心管中行超声破碎(无菌冰浴,φ6 变幅杆,功率 400 W,超声时间 10 s,间隔时间 10 s,共 10 次),然后置于冷冻离心机中,4 ℃,2 000 r/min,离心 10 min,取上清液分装于无菌 EP 管中保存备用(保存温度为常温、4 ℃、-20 ℃)。

1.5 HAHS 蛋白含量的测定

采用 BCA (Bicinchoninic acid)法,准备一系列 BSA 标准品,先制作标准曲线和方程式,再测定 HAHS 的吸光度值[D(562)],根据标准曲线得出的方程式计算蛋白含量。

1.6 琼脂糖扩散法(K-B 法)测定新鲜羊膜和"去上皮"羊膜体外抗菌活性以及 HAHS 的抗菌谱

在新鲜 MH 琼脂平板上(链球菌用哥伦比亚血平板,真菌用 PDA 平板),加入培养至对数生长期并稀释为 5×10^5 CFU/ml 的细菌(或真菌)菌液 10 μl,立即用灭菌 L 型玻璃棒均匀涂布菌液于培养基表面,室温下静置干燥 2 min 后,用打孔器在培养基上等距离打 5 个孔(直径 6 mm),周围 4 孔加入 50 μl 浓度为 1 500 mg/L 的新鲜 HAHS,中央一孔加入 50 μl 0.01 mol/L PBS 液作为阴性对照,加样时注意液体不溢出孔外,37 ℃孵箱培养 12 ~ 16 h(真菌 1 ~ 3 d)后观察结果。

新鲜羊膜和"去上皮"羊膜则将 2 个前表面分别朝向涂有菌液的培养基表面平铺贴附,不需打孔。

1.7 微量肉汤稀释法比较 HAHS 与眼表常用抗生素抗菌作用强弱

超纯水溶解抗生素,制成 1 280 mg/L 的储备液,用等量无菌的 0.02% 乙酸(含 0.4% BSA)稀释,再用 0.01% 乙酸(含 0.2% BSA)溶液对等量稀释后的溶液再进行一系列倍比稀释,得到质量浓度为 640、320、160……2.50、1.25 mg/L 的系列倍比稀释液,4 ℃下保存备用;本实验中制得的 HAHS 蛋白浓度为 1 500 mg/L,在此浓度基础上用 0.01% 乙酸(含 0.2% BSA)溶液倍比稀释,得到质量浓度为 1 500、750、375 …… 5.85、2.93 mg/L的系列倍比稀释液。

金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和大肠杆菌 ATCC25922 作为待测菌,HAHS 对每种待测菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimal bactericidal concentration,MBC)将分别与 5 种抗生素比较。

向 96 孔板的第 1 ~ 11 孔各加入 90 μl 浓度为 2×10^5 ~ 7×10^5 CFU/ml 对数生长期的菌液,第 12 孔加入 100 μl MH 肉汤作为空白对照,向第 1 ~ 10 孔逐一加入倍比稀释后的待测 HAHS 或抗生素药液 10 μl,第 11 孔加入 10 μl 0.01 mol/L PBS 液作为阴性对照,37 ℃孵箱培养 12 ~ 16 h 后用酶标仪 600 nm 紫外光测定光密度值[D(600)],MIC 的确定按照比阴性对照孔(第 11 孔)的浑浊程度低 50% 以上的最小质量浓度计算。

取 MIC 浓度孔以上肉眼未见浑浊的 2 个高浓度孔,吸出 10 μl 培养液均匀涂布到 MH 琼脂平板上,37 ℃培养 18 h 后平板菌落计数,计数小于 5 CFU/平板的培养液孔的对应浓度即为 HAHS 或抗生素对该菌的最小杀菌浓度 MBC。

分别用 3 名产妇的 HAHS 行了 3 组相同实验,每组重复 3 次。

1.8 影响 HAHS 抗菌活性的因素

以 Robinson 等[11]比较酶抗菌活力的方法为指导,通过比较等量的待测菌液,与等量的不同水平影响因素作用后的 HAHS,反应 1 h 后吸光度值 D(600)下降的幅度大小,来研究温度、pH 值及保存时间对 HAHS 抗菌活性的影响。金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为待测菌。

1.8.1 pH 值的影响 配制 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 共 5 个 pH 值的 0.01 mol/L PBS 液,抽滤灭菌。在 96 孔培养板中的第

1 ~5 孔,将 5 种 PBS 液 25 μl 分别与 5 μl 浓度为 1 500 mg/L 的 HAHS 混匀,第 6 孔加入 30 μl PBS 液作为阴性对照,室温静置 10 min 后向每孔中加入 70 μl 约 5×10^7 CFU/ml 对数生长期的菌液,设 3 个重复,加完后立即测定各孔 $D(600)$ 值;37 ℃孵箱 1 h 后再测各孔 $D'(600)$ 值。计算前后之差值 $\triangle D(600) = D(600) - D'(600)$。

1.8.2　温度的影响　　将装有新鲜 HAHS 的 EP 管分别置于 -20、4、20、37、60、80 ℃,放置 1 h 取出,然后于 96 孔板 1 ~6 孔依次取 5 μl 不同温度放置后的上清液,分别与 95 μl 约 5×10^7 CFU/ml 对数生长期的菌液混合,第 7 孔用 PBS 液与菌液混合作为阴性对照,设 3 组重复,加样后立即测定各孔 $D(600)$ 值;置于 37 ℃孵育 1 h,再测各孔 $D'(600)$ 值;计算 $\triangle D(600)$。

1.8.3　保存时间的影响　　采用上述研究温度对抗菌活性影响类似的方法,选取 4 ℃和 20 ℃ 2 种保存温度,在 1、3、7、14、28、56 d 共 6 个时间点进行实验研究。

1.9　透射电镜标本制作

对数生长期的菌液,金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和大肠杆菌 ATCC259227 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,无菌生理盐水洗涤,再用新鲜 MHB 培养基稀释成 10^6 CFU/ml 的细菌悬液。取 1 ml 细菌悬液,实验组加入浓度为 1 500 mg/L 的 HAHS 200 μl,对照组加 200 μl 生理盐水,37 ℃放置 30 min 后 2 000 r/min 低温离心,弃上清,无菌生理盐水洗涤 2 次,2.5% 戊二醛固定,0.01 mol/L PBS 液漂洗 2 次,10 min/次,1% 锇酸后固定 2 h,丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄切片,铀染,铅染,荷兰飞利浦 TECNAI10 透射电子显微镜观察 HAHS 对细菌的杀伤作用。

1.10　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　新鲜羊膜及“去上皮”羊膜的体外抗菌活性的检测

结果表明,以金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为待测菌,“去上皮”羊膜以 2 种方向贴附于培养基均无抑菌环产生,边缘有菌落长入覆盖羊膜(图 1A、B),HE 染色切片证实羊膜上皮细胞刮除完全(图 2A);而新鲜人羊膜以 2 种方向贴附均有明显的抑菌环出现(图 1C、D),HE 染色证实单层立方上皮细胞完整(图 2B)。

2.2　新鲜 HAHS 抗菌谱的测定

通过 K-B 法定性测试了 HAHS 的抗菌谱,结果显示:HAHS 对本实验选用的 3 个标准菌株,4 个临床分离敏感菌株,3 个临床分离真菌菌株及粪肠球菌临床多重耐药株共 11 种菌株均有明显抑菌作用,抑菌环明显(图 3),而对阴沟杆菌、大肠杆菌和 MRSA 的临床多重耐药菌株均无明显的抑菌作用。

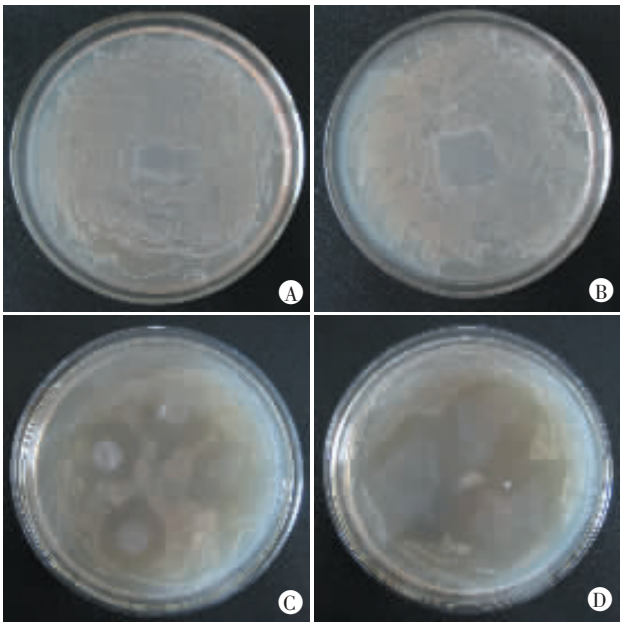
2.3　新鲜 HAHS 与眼科临床上常用抗生素的 MIC 及 MBC 值的比较

抗菌物质以分子为单位发挥抗菌作用,以物质的量浓度进行抗菌活性的比较,比以质量浓度比较更为准确。MIC 及 MBC 值越小,说明抗菌活性越强。表 1 中,HAHS 的 MIC 值明显小于氯霉素,与克林霉素相当,大于其他 3 种抗生素;MBC 值却不明显大于 5 种中任何一种抗生素。表 2 中,HAHS 的 MIC 值小于磺胺醋酰钠和头孢呋辛钠,与妥布霉素相当,大于庆大霉素和诺氟沙星;MBC 值却也不明显大于 5 种中任何 1 种抗生素。另外,从表 1、2 中我们还可以看出,HAHS 的 MBC = MIC,而抗生素的 MBC > MIC,说明 HAHS 的抗菌作用就是直接的杀菌作用,不同于抗生素。本结果符合稀释法药敏试验标准质控菌株的 MIC 范围。

2.4　影响 HAHS 抗菌活性的因素

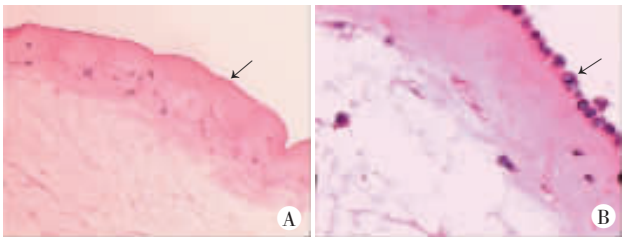
2.4.1　不同 pH 值对 HAHS 抗菌活性的影响　　HAHS 在 pH 值 7.0 的条件下对金黄色球菌葡萄 ATCC25923 有良好的杀菌作用[$\triangle D(600) = 0.003\ 38$],而且在其余 4 个不同 pH 值下(pH 值 5.0、6.0、8.0 和 9.0),HAHS 对 ATCC25923 同样具有良好的杀灭作用,各组与 pH 值 7.0 条件下的抗菌活性未见显著差异。

2.4.2　不同处理温度对 HAHS 活性的影响　　HAHS 经 37 ℃处理后对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 有良好的杀菌效果[$\triangle D(600) = 0.002\ 95$],而且 -20、4、20 ℃及 60 ℃ 4 个不同温度处理的 HAHS 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性较 37 ℃ 没有明显变化。然而经过 80 ℃处理的 HAHS 的抗菌活性较其他各个温度有明显的降低[$\triangle D(600) = 0.001\ 52$, $P < 0.05$],但仍表现出一定的杀菌作用。



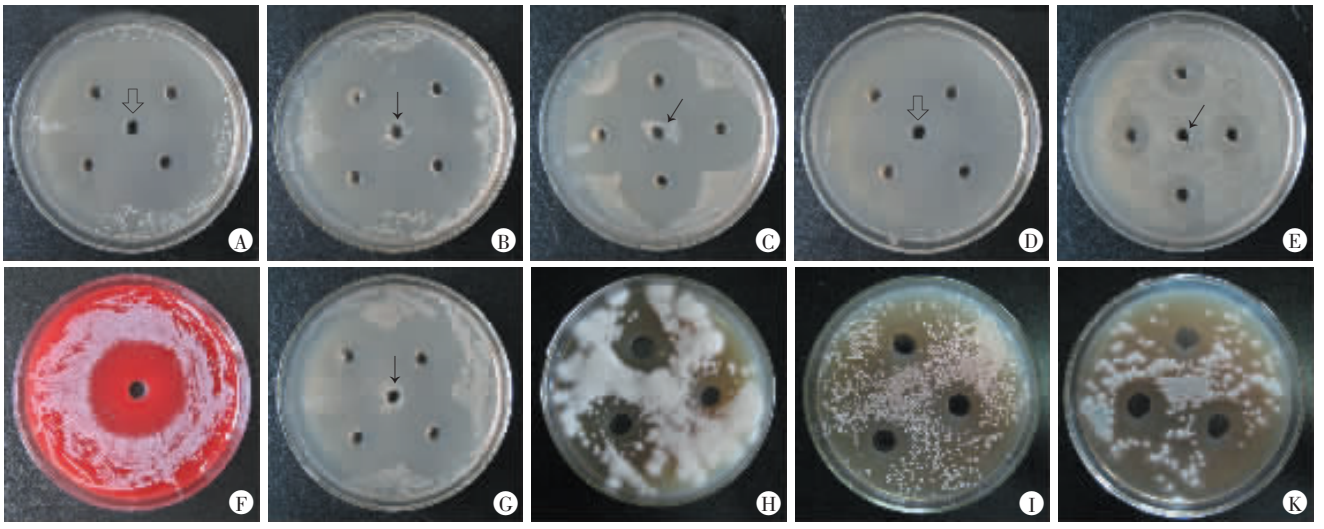
A:“去上皮”羊膜前表面向下贴附于培养基;B:“去上皮”羊膜前表面向上贴附于培养基;C: 新鲜羊膜基底膜向下贴附于培养基;D:新鲜羊膜基底膜向上贴附于培养基

图 1　新鲜人羊膜及“去上皮”羊膜的体外抗菌活性的测定



A:“去上皮”羊膜　↑:羊膜上皮细胞刮除干净; B: 新鲜羊膜　↑:羊膜单层立方上皮完整

图 2　羊膜 HE 染色观察结果　(HE ×200)



A:金黄色葡萄球菌 ATCC25923; B:大肠埃希菌 ATCC25922; C:铜绿假单胞菌 ATCC27853; D:表皮葡萄球菌; E:奇异变形杆菌; F:肺炎链球菌; G:粪肠球菌(多重耐药菌株); H: 茄病镰刀菌; I:白色念珠菌; K: 烟曲霉菌

↑: 中央阴性对照孔周围见细菌生长; ⇧: 中央阴性对照孔周围本应该见菌落生长,但已被周边4孔 HAHS 的抑菌圈所覆盖

图3 新鲜人羊膜匀浆上清液抗菌谱的初步测定

表1 羊膜匀浆上清液和5种抗生素对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC 及 MBC 检测

浓度	青霉素	克林霉素	氯霉素	利福平	左氧氟沙星	羊膜匀浆上清液
MIC	0.701 (0.250)	2.167 (1.000)	24.758 (8.000)	0.152~0.304 (0.125~0.250)	0.337~0.675 (0.125~0.250)	11.171~2.343 (4.688~9.375)
MBC	2.804 (1.000)	8.668 (4.000)	99.032 (32.000)	1.216~2.432 (1.000~2.000)	1.350~2.700 (0.500~1.000)	2.343 (9.375)

括号外数据为物质的量浓度(μmol/L);括号内数据为质量浓度(mg/L)

表2 羊膜匀浆上清液和5种抗生素对大肠杆菌 ATCC25922 的 MIC 及 MBC 检测

浓度	庆大霉素	妥布霉素	磺胺醋酰钠	头孢呋辛钠	诺氟沙星	羊膜匀浆上清液
MIC	1.047 (0.500)	1.069~2.139 (0.500~1.000)	125.865~251.731 (32.000~64.000)	2.240~4.481 (1.000~2.000)	0.392~0.783 (0.125~0.250)	1.875 (75.000)
MBC	4.188 (2.000)	2.139~4.278 (1.000~2.000)	50.346 (128.000)	4.481 (2.000)	1.566~3.132 (0.500~1.000)	1.875 (75.000)

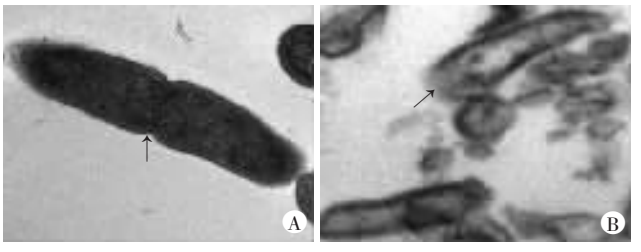
括号外数据为物质的量浓度(μmol/L);括号内数据为质量浓度(mg/L)

2.4.3 不同保存时间对 HAHS 抗菌活性的影响 我们分别观察了4 ℃和20 ℃下 HAHS 保存1、3、7、14、28、56 d后抗菌活性的变化。结果证实,在2种保存温度下,随着保存时间的延长,HAHS 的抗菌活性没有明显变化,保存 56 d 后[4 ℃和20 ℃的△D(600)分别为0.002 97和0.002 81],其对金葡菌 ATCC25923 仍有良好的杀灭作用。

2.5 透射电镜观察结果

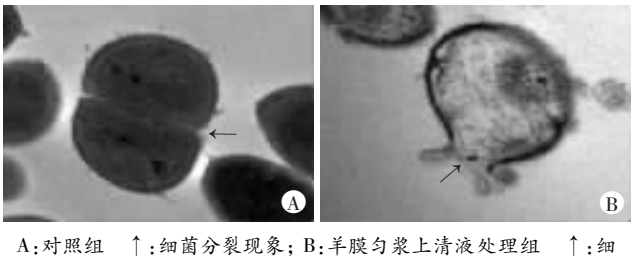
2.5.1 HAHS 对大肠杆菌形态结构的影响 透射电镜观察结果显示,对照组大肠杆菌菌体完整、饱满,表面光滑平直,常见分裂现象(图4A)。经 HAHS 作用1 h后的大肠杆菌,细菌干瘪皱缩,粗细不一,长短各异。表面粗糙不平,很难看到分裂相。一端膨大呈棒槌样,细胞膜破裂,表面有明显孔洞,细胞内容物外溢(图4B)。

2.5.2 HAHS 对金黄色葡萄球菌形态结构的影响 在透射电镜下观察,对照组金黄色葡萄球菌为球型,饱满,细胞壁、细胞膜完整,分裂增殖活跃(图5A)。经 HAHS 作用1 h后,细菌形态不规则,表面粗糙不平,几乎找不到分裂相。细胞壁、细胞膜上受到严重破坏,形成明显孔洞,原生质扩散流出(图5B)。



A:对照组(×39 000) ↑:细菌分裂现象; B:羊膜匀浆上清液处理组(×30 000) ↑:细菌细胞膜形成空洞

图4 羊膜匀浆上清液对大肠杆菌结构的影响 (TEM)



A:对照组 ↑:细菌分裂现象; B:羊膜匀浆上清液处理组 ↑:细菌细胞膜形成孔洞

图5 羊膜匀浆上清液对金黄色葡萄球菌结构的影响 (TEM×39 000)

3　讨论

目前临床多采用深低温保存的羊膜重建静止期眼表疾病的眼表,用此法保存的羊膜其上皮细胞已经灭活,移植后羊膜需要受眼的眼表上皮细胞增殖、移行并覆盖才能完成眼表羊膜移植区的上皮化;同时羊膜组织中所含的各种利于促进眼表组织正常修复的活性成分保存后是否会出现效价衰减或其他变化等尚不十分清楚。陈家祺等[12]证实新鲜羊膜移植能更有效地用于重建角结膜表面,减轻炎性反应,减少新生血管的生成,抑制纤维组织增生。本实验中,新鲜羊膜及其匀浆上清液具有明显的抗菌作用,而"去上皮"羊膜无此作用,证实羊膜中抗菌活性物质存在于其上皮细胞内,基于此我们认为临床眼表重建手术应尽量采用新鲜羊膜。若有进一步的实验证实将新鲜人羊膜制成匀浆上清液后其中各种有利于促进眼表组织正常修复的活性成分未受到明显破坏,则 HAHS 可能成为重建眼表的一种更为便捷有效的治疗手段。

本实验还证实了 HAHS 的抗菌谱较广,对于眼部感染常见的 G^+、G^-、真菌甚至多重耐药菌均有明显的抗菌作用,且通过与眼科 10 种常用抗生素 MIC 及 MBC 的比较,发现其抑菌活性强于氯霉素、磺胺和头孢呋辛钠,与克林霉素和妥布霉素相当,杀菌活性不低于所选 10 种抗生素。再考虑到采用本实验方法所制备的 HAHS 除了抗菌蛋白还混有其他蛋白,故实际含有抗菌蛋白的浓度应低于测量浓度 1 500 mg/L,这也使测得 HAHS 的 MIC 及 MBC 值比真实值偏大。这与目前较为认同的观点(人 β-防御素具有强效,快速,非特异的杀灭细菌、真菌、被膜病毒、原生动物等病原体的作用)一致。pH 值、温度及 4 ℃和 20 ℃ 2 种保存温度下保存时间对 HAHS 抗菌活性的研究结果表明,HAHS 的性质十分稳定,具备临床应用的条件。而且目前有研究发现,抗菌肽与抗生素联合应用可产生协同作用。Minahk 等[13]发现 enterocinCRL35 与四环素、红霉素、氯霉素联合应用时,可使上述抗生素最低抑菌浓度显著下降,其原因可能与细菌细胞膜"孔道"形成有助于抗生素进入细菌胞体内有关。因此,我们认为 HAHS 可能是临床上治疗眼部感染性疾病的一种方便有效的方法,特别是在病原学诊断不明及病情较顽固时。

对于抗菌肽的抗菌机制已有多种不同的看法,目前最为公认的研究结果是认为抗菌肽与细胞膜作用,使膜蛋白凝聚、失活,形成离子通道,引起膜通透性改变,胞内容物外溢,最后导致细菌死亡,即细胞膜损伤机制[14]。本实验中,HAHS 的 MIC = MBC,说明其抗菌作用就是直接的杀菌作用,透射电镜观察结果也支持这一理论。大多数已报道的抗菌肽对 G^- 菌的抗菌效果强于 G^+ 菌[15],这是由于大多数抗菌肽(包括 HBD)是阳离子抗菌肽,属于中性或偏碱性蛋白,能通过与 G^- 菌外膜上的脂多糖等负电物质相互作用,从而破坏膜结构以发挥抗菌作用。而 G^+ 菌无脂多糖膜,只能通过表面肽聚糖中的胞壁酸、糖醛酸等带少量负电荷。但本实验自制的 HAHS 对金葡菌 ATCC25923 的 MIC 却明显低于大肠杆菌 ATCC25922,这可能与羊膜中除了含有 HBD1 ~ HBD3,还有 SLPI 和 elafin 等其他抗菌物质有关[8,9],但需要进一步研究。

参考文献:

[1] Seo J H, Kim Y H, Kim J S. Properties of the amniotic membrane may be applicable in cancer therapy [J]. Med Hypotheses, 2008, 70(4): 812 - 814.

[2] Thadepalli H, Bach V T, Davidson E C Jr. Antimicrobial effect of amniotic fluid[J]. Obstet Gynecol, 1978, 52(2): 198 - 204.

[3] Talmi Y P, Sigler L, Inge E, *et al*. Antibacterial properties of human amniotic membranes[J]. Placenta, 1991, 12(3): 285 - 288.

[4] Kjaergaard N, Helmig R B, Schonheyder H C, *et al*. Chorioamniotic membranes constitute a competent barrier to group b streptococcus *in vitro*[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1999, 83(2): 165 - 169.

[5] Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, *et al*. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001, 94(2): 224 - 229.

[6] McPhee J B, Hancock R E. Function and therapeutic potential of host defence peptides[J]. J Pept Sci, 2005, 11(11): 677 - 687.

[7] Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates[J]. Immunol Rev, 2004, 198: 169 - 184.

[8] King A E, Paltoo A, Kelly R W, *et al*. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes[J]. Placenta, 2007, 28(2 - 3): 161 - 169.

[9] Stock S J, Kelly R W, Riley S C, *et al*. Natural antimicrobial production by the amnion [J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 196(3): 255. e1 - 255. e6.

[10] Meller D, Tseng S C. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(5): 878 - 886.

[11] Robinson J M, Hardman J K, Sloan G L. Relationship between lysostaphin endopeptidase production and cell wall composition in Staphylococcus staphylolyticus[J]. J Bacteriol, 1979, 137(3): 1158 - 1164.

[12] 陈家祺, 周世有, 黄　挺, 等. 新鲜羊膜移植治疗严重的急性炎症期及瘢痕期眼表疾病的临床研究[J]. 中华眼科杂志, 2000, 36(1): 13 - 17.

[13] Minahk C J, Dupuy F, Morero R D. Enhancement of antibiotic activity by sub-lethal concentrations of enterocin CRL35[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(2): 240 - 246.

[14] Jenssen H, Hamill P, Hancock R E. Peptide antimicrobial agents [J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(3): 491 - 511.

[15] Mendez-Samperio P. Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections[J]. Peptides, 2008, 29(10): 1836 - 1841.

(编辑　栾　嘉)