

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.09.002

· 论 著 ·

## 隐丹参酮对表皮葡萄球菌生物膜的抑制作用

易 辉, 祖瑞铃, 易玉玲, 李 燕

(成都中医药大学医学技术学院, 成都 611137)

**[摘要]** **目的** 探索隐丹参酮对表皮葡萄球菌(SE)生物膜不同成熟阶段的抑制效果。**方法** 体外构建 SE 生物膜模型, 确定其黏附、聚集、成熟阶段时间点; 通过半定量黏附实验、XTT 法和扫描电镜检测不同浓度隐丹参酮作用下 SE 不同成熟阶段中生物膜基质量、膜内菌代谢活性和微观形态结构的变化。**结果** SE 生物膜黏附、聚集和成熟时间点分别为 6、24、48 h; 对于黏附阶段生物膜, 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的隐丹参酮均能明显减少其生物膜基质量和杀灭膜内菌, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且隐丹参酮抑制作用 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  优于 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 同时均能破坏其微观形态结构; 对于聚集与成熟阶段生物膜, 仅 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的隐丹参酮能明显减少其生物膜基质量和杀灭膜内菌, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 同时能破坏其微观形态结构, 而 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的隐丹参酮则无明显抑制效果( $P > 0.05$ )。**结论** 隐丹参酮对 SE 生物膜不同成熟阶段均具有一定抑制效果, 且存在一定的剂量效应。

**[关键词]** 表皮葡萄球菌; 生物膜; 隐丹参酮

**[中图分类号]** R378.1<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)09-0798-06

### Inhibitory effect of cryptotanshinone on biofilm of *Staphylococcus epidermidis*

YI Hui, ZU Rui-ling, YI Yu-ling, LI Yan (College of Medical Technology, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the inhibitory effect of cryptotanshinone on different maturation stages of *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) biofilm. **Methods** The biofilm model of *S. epidermidis* was constructed in vitro, the timing of adhesion, accumulating, and maturation was determined; matrix quantity, bacterial metabolism, microstructure of biofilm were detected with semi-quantitative adhesion test, XTT assay, and scanning electron microscope(SEM) respectively. **Results** The timing of adhesion, accumulating, and maturation of *S. epidermidis* biofilm were 6h, 24h, and 48h respectively; in adhesion period, cryptotanshinone at the concentration of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$  could both obviously reduce the matrix and kill bacteria inside biofilm, difference was statistically significant( $P < 0.05$ ), inhibitory effect of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$  cryptotanshinone was better than 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $P < 0.05$ ), the microstructure was destroyed by both concentrations. During accumulating and mature period, only cryptotanshinone at 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$  could reduce the matrix of biofilm and kill bacteria inside biofilm ( $P < 0.05$ ), the microstructure was damaged by cryptotanshinone at concentration of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , while 32g/mL of cryptotanshinone had no obvious inhibitory effect( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Cryptotanshinone has a certain inhibitory effect on different stages of *S. epidermidis* biofilm, and there is a certain dose effect.

**[Key words]** *Staphylococcus epidermidis*; biofilm; cryptotanshinone

[Chin J Infect Control, 2017, 16(9): 798-803]

[收稿日期] 2016-11-24

[基金项目] 四川省科技厅应用基础项目(2015JY0159)

[作者简介] 易辉(1991-), 女(汉族), 四川省成都市人, 硕士研究生, 主要从事感染微生物的实验诊断及耐药性研究。

[通信作者] 李燕 E-mail: 1067267085@qq.com

近年,高分子材料制成的医疗植入物的广泛应用,如导管、人工心瓣膜、人工关节等,表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, SE)所致感染日趋严重,已位于医院感染病原体的第四位。研究<sup>[1]</sup>表明,细菌黏附于医疗植入物表面形成生物膜是该菌致病、难以治愈、容易复发的主要原因。目前,临床多采用大剂量的抗菌药物治疗此类感染,造成该菌耐药性加剧,相对而言,中药不易造成细菌耐药,在新药研发中具有一定的优势。丹参作为川产道地药材,临床常用功效为祛瘀止痛、活血通经、清心除烦,其有效成分分为脂溶性的丹参酮和水溶性的丹酚酸两大类,其中丹参酮类化合物(即总丹参酮)还具有抗菌、抗炎作用,但研究和临床应用较少。已有研究<sup>[2]</sup>发现,丹参根甲醇提取物对 SE、金黄色葡萄球菌、巨大芽孢杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌等浮游菌表现出较强的抑菌活性,且价格低廉,具有进一步开发应用潜力。目前,国内外尚未见丹参酮抑制细菌生物膜形成的相关报道,本课题组的前期研究中,通过测定总丹参酮及其主要单体成分丹参酮 I、丹参酮 II A、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 对 SE 的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小生物膜抑菌浓度(minimum biofilm inhibitory concentration, MBIC),发现隐丹参酮为丹参酮类化合物中对 SE 抑菌活性最强的单体成分,故本研究选用隐丹参酮作为靶药,以万古霉素为阳性对照药物,观察不同浓度药物作用下 SE 生物膜形成过程不同阶段基质量、膜内菌代谢活性和微观形态结构的变化,探索不同浓度隐丹参酮对 SE 生物膜不同成熟阶段的抑制效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验菌株 表皮葡萄球菌 1457(生物膜阳性株)和表皮葡萄球菌 ATCC 12228(生物膜阴性株),均由复旦大学瞿涤教授惠赠;临床菌株:本实验室从成都地区两所医院收集、鉴定、保存的 5 株临床生物膜阳性菌株<sup>[3-4]</sup>。

1.1.2 主要试剂与仪器 包括隐丹参酮对照品(成都普菲德生物公司)、万古霉素标准品(中国食品药品检定研究院)、XTT 试剂(南京凯基生物科技公司)、无菌 96 孔板和 6 孔板(美国 Costar 公司)、酶标仪(Nanodrop 2000)、扫描电镜(日立 1000B)。

### 1.2 方法

1.2.1 SE 黏附、聚集、成熟阶段生物膜的建立 参照文献<sup>[5-6]</sup>方法略做改动:SE 接种至 TSB 培养基 37℃ 过夜培养,调节菌液浓度至  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 200  $\mu$ L/孔加至 96 孔板中,分别于 37℃ 0、3、6、12、24、36、48、72、96 h 结束培养,无菌 PBS 漂洗 3 次;2.5%戊二醛固定 30 min,弃去孔内液体;0.1%结晶紫染液染色 5~15 min,自来水冲洗未黏附染料,室温晾干;加入 95%乙醇微振荡,酶标仪检测  $A_{570}$  值,绘制生物膜基质生长曲线。

1.2.2 药物处理 SE 接种至 TSB 中 37℃ 过夜培养,调节菌液浓度至  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 200  $\mu$ L/孔加至 96 孔板中 37℃ 培养,分别于 1.2.1 确立的时间点结束培养,无菌 PBS 漂洗 3 次,200  $\mu$ L/孔加入以下实验分组(见表 1)的药液,37℃ 培养 24 h。

表 1 生物膜形成阶段和实验分组情况

Table 1 Biofilm formation periods and experimental groups

生物膜形成阶段及实验分组	干预药物	药物终浓度( $\mu$ g/mL)
6 h(黏附)		
A1	不加药对照	0
A2	万古霉素	32
A3	高浓度隐丹参酮	128
A4	低浓度隐丹参酮	32
24 h(聚集)		
B1	不加药对照	0
B2	万古霉素	32
B3	高浓度隐丹参酮	128
B4	低浓度隐丹参酮	32
48 h(成熟)		
C1	不加药对照	0
C2	万古霉素	32
C3	高浓度隐丹参酮	128
C4	低浓度隐丹参酮	32

1.2.3 半定量黏附实验检测 SE 生物膜基质的变化 参照文献<sup>[7]</sup>方法略做改动:按照 1.2.2 中方法处理后,无菌 PBS 漂洗 3 次,戊二醛固定 30 min,结晶紫染液染色 5~15 min,自来水冲洗,室温晾干,加入 95%乙醇微振荡,检测  $A_{570}$  值。

1.2.4 XTT 法检测 SE 生物膜内细菌代谢活性变化 参照文献<sup>[8-9]</sup>方法略做改动:按照 1.2.2 中方法处理后,无菌 PBS 漂洗 3 次,加入 100  $\mu$ L MH 培养基和 50  $\mu$ L XTT 工作液,37℃ 避光培养 1~4 h,酶标仪检测  $A_{450}$  值。

1.2.5 扫描电镜观察 SE 生物膜微观形态变化 按文献<sup>[10]</sup>方法略做改动:调节 SE 菌液浓度至  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 3 mL/孔加入到无菌 6 孔板中,每孔

加入一片无菌玻片,分别于 37℃ 6、24、48 h 结束培养,取出玻片用无菌 PBS 漂洗 3 次,然后放入新的无菌 6 孔板中,3 mL/孔加入表 1 中实验分组的药液,37℃ 培养 24 h,取出玻片用无菌 PBS 漂洗 3 次,戊二醛 4℃ 固定 2 h,无菌 PBS 漂洗,依次用浓度为 30%、50%、70%、70%、80%、90%、100% 的乙醇,4℃ 梯度脱水 10 min,叔丁醇置换及真空干燥后喷金进行扫描电镜观察拍照(10 000×,10 μm 视野)。

1.3 数据分析 应用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,计量资料均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 SE 生物膜生长曲线及黏附、聚集和成熟时间点确立 SE 生物膜生长有 3 个增长期,分别是 0~12 h、12~36 h 和 36~72 h,其中 0~12 h 增长最快,对应生物膜黏附期,此时浮游 SE 正不断黏附到聚丙烯微孔板上;12~36 h 增长第二快,对应生物膜聚集期,此时已经黏附于聚丙烯微孔板上的 SE 相互聚集并合成分泌大量胞外基质逐渐形成微菌落,同时生物膜也逐渐走向成熟;36~72 h 生物膜基质质量增长缓慢,对应生物膜成熟期,此时主要是

已形成的微菌落之间相互融合生长,发育成具有蘑菇状结构的成熟生物膜。因此,本实验分别选择各阶段中间时间点 6、24、48 h 作为 SE 生物膜的黏附、聚集和成熟点进行药物干预。见图 1。表皮葡萄球菌 ATCC 12228 为生物膜形成阴性株,不能在聚丙烯微孔板上形成生物膜,故其黏附于微孔板上的细菌量基本保持不变。

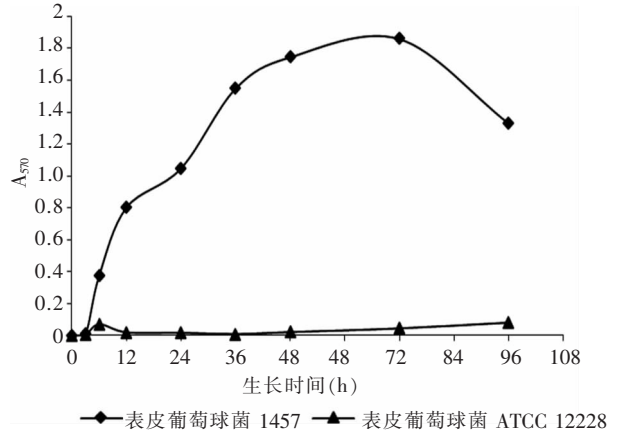
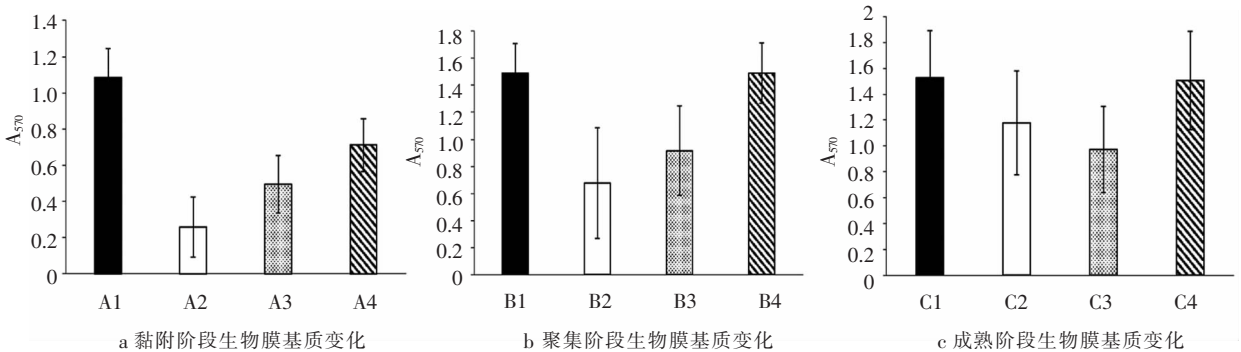


图 1 SE 生物膜生长曲线

Figure 1 Growth curves of *S. epidermidis* biofilm

2.2 药物作用下 SE 生物膜基质的变化 SE 不同阶段生物膜基质的变化见图 2。



注: A1、B1、C1 分别为黏附、聚集、成熟阶段不加药对照组; A2、B2、C2 分别为黏附、聚集、成熟阶段 32 μg/mL 万古霉素作用组; A3、B3、C3 分别为黏附、聚集、成熟阶段 128 μg/mL 隐丹参酮作用组; A4、B4、C4 分别为黏附、聚集、成熟阶段 32 μg/mL 隐丹参酮作用组。数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示

图 2 SE 生物膜基质的变化

Figure 2 Change in quantity of *S. epidermidis* biofilm matrix

**黏附阶段:**与不加药对照组相比,32 μg/mL 万古霉素组、128 μg/mL 隐丹参酮组和 32 μg/mL 隐丹参酮组生物膜基质量均明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );但 128 μg/mL 和 32 μg/mL 隐丹参酮组的抑制作用均不及 32 μg/mL 万古霉素组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );32 μg/mL 隐丹参酮组又不及 128 μg/mL 隐丹参酮组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

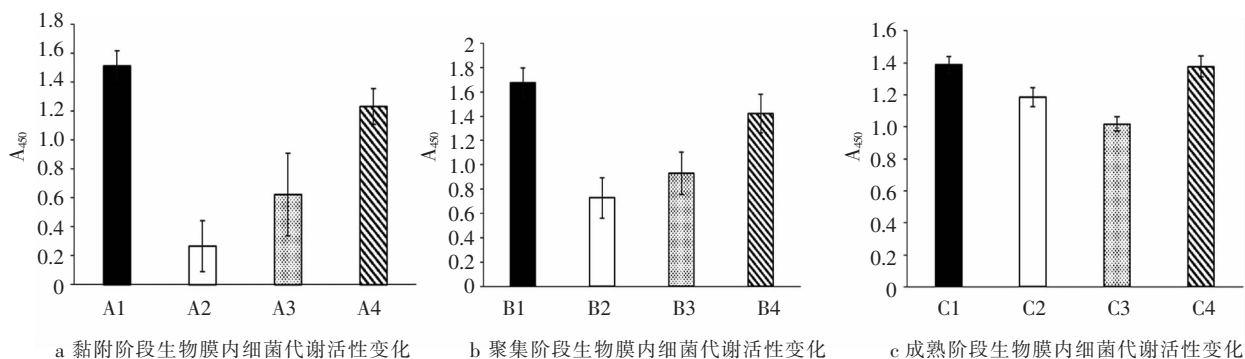
**聚集阶段:**与不加药对照组相比,32 μg/mL 万古霉素组和 128 μg/mL 隐丹参酮组生物膜基质量均明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 32 μg/mL 隐丹参酮组则无降低。

**成熟阶段:**与不加药对照组相比,仅128 μg/mL 隐丹参酮组明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),32 μg/mL 万古霉素组和 32 μg/mL 隐丹参

酮组的降低无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

2.3 药物作用下 SE 生物膜内细菌代谢活性变化

SE 不同阶段生物膜膜内菌代谢活性变化见图 3。黏附和聚集阶段呈现结果一致:与不加药对照组相比,32 μg/mL 万古霉素组、128 μg/mL 隐丹参酮组和 32 μg/mL 隐丹参酮组生物膜膜内菌代谢活性均明显降低,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );但 128 μg/mL 和 32 μg/mL 隐丹参酮组的抑制作用均不及 32 μg/mL 万古霉素组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );32 μg/mL 隐丹参酮组又不及 128 μg/mL 隐丹参酮组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。成熟阶段:与不加药对照组相比,仅 32 μg/mL 万古霉素组和 128 μg/mL 隐丹参酮组明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 32 μg/mL 隐丹参酮组则无明显降低。



注:A1、B1、C1 分别为黏附、聚集、成熟阶段不加药对照组;A2、B2、C2 分别为黏附、聚集、成熟阶段 32 μg/mL 万古霉素作用组;A3、B3、C3 分别为黏附、聚集、成熟阶段 128 μg/mL 隐丹参酮作用组;A4、B4、C4 分别为黏附、聚集、成熟阶段 32 μg/mL 隐丹参酮作用组。数据均以均值  $\bar{x} \pm s$  表示

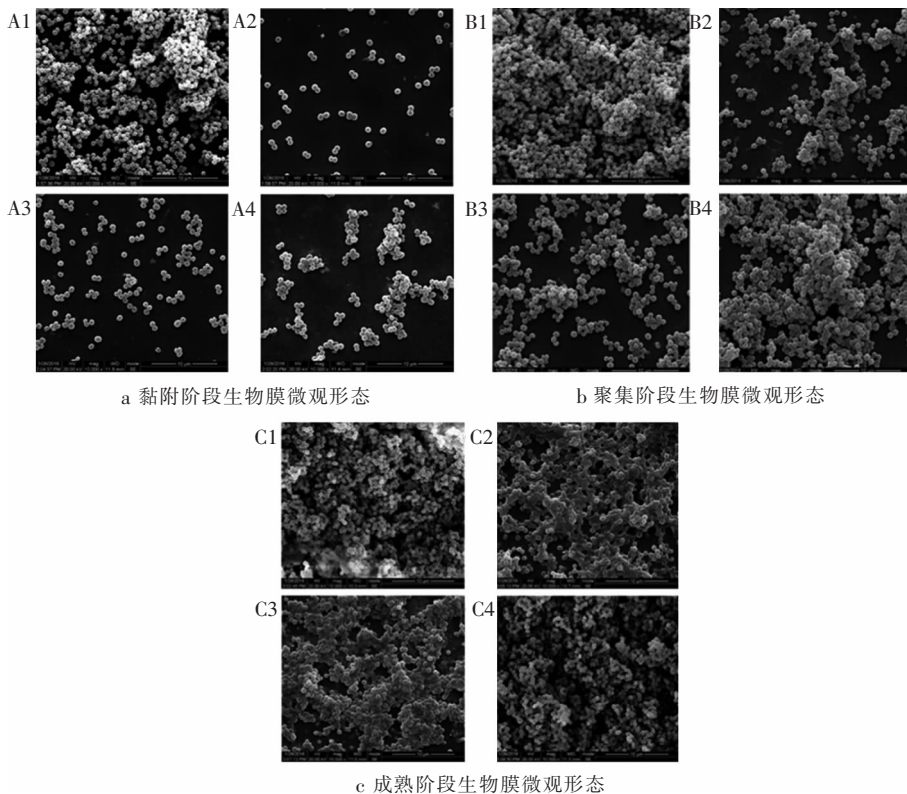
图 3 SE 生物膜内细菌代谢活性变化

Figure 3 Change in metabolism of *S. epidermidis* inside biofilm

2.4 药物作用下 SE 生物膜微观形态变化

扫描电镜下 SE 不同阶段生物膜微观形态见图 4。黏附阶段:不加药对照组生物膜形态结构完整,而万古霉素组、高浓度和低浓度隐丹参酮组生物膜结构均被破坏瓦解。聚集和成熟阶段:呈现相似的抑制效果,不加药对照组生物膜结构复杂完整,膜内细菌形态

正常,SE 分泌了大量胞外基质将细菌包裹于生物膜之中,而低浓度隐丹参酮组生物膜结构无明显变化,万古霉素组和高浓度隐丹参酮组生物膜结构虽然存在,但是膜结构远远不如不加药对照组完整紧密,且膜厚度明显减低,膜内细胞可见变形、皱缩、或死亡。



注：A1、B1、C1 分别为黏附、聚集、成熟阶段不加药对照组；A2、B2、C2 分别为黏附、聚集、成熟阶段 32 μg/mL 万古霉素作用组；A3、B3、C3 分别为黏附、聚集、成熟阶段 128 μg/mL 隐丹参酮作用组；A4、B4、C4 分别为黏附、聚集、成熟阶段 32 μg/mL 隐丹参酮作用组

图 4 扫描电镜下 SE 生物膜微观形态 (10 000 × , 10 μm)

Figure 4 Change in microstructure of *S. epidermidis* biofilm observed by SEM (10 000 × , 10 μm)

### 3 讨论

一直以来,中药在控制细菌感染及多重耐药性方面具有独特的优势,已成为继抗生素之后又一抗感染药物研究的重点。近年来,国内外学者研究发现中药或中药活性成分在抑制细菌生物膜方面显现了一定的优势,Zeng 等<sup>[11]</sup>发现穿心莲内酯能够抑制铜绿假单胞菌生物膜胞外基质的形成,并与多种抗菌药物联用表现出协同抗菌效果;Pammi 等<sup>[12]</sup>发现,金合欢醇能够抑制 SE 生物膜形成,并与利福平和万古霉素显现出协同抗菌作用。丹参作为常用的天然药物,临床主要用于治疗心脑血管疾病,对其活血化淤、清心除烦的药理药效研究较多,而对丹参的抗炎、抗菌作用研究和临床应用较少。丹参的脂溶性提取物(丹参酮类化合物)作为丹参发挥抗菌作用的最主要物质基础,对大多数细菌表现出抑制作用,特别是对葡萄球菌属细菌等革兰阳性菌<sup>[13-14]</sup>。Lee 等<sup>[13]</sup>测定了隐丹参酮和二氢丹参酮 I 对多种革兰

阳性菌和阴性菌的 MIC 值,发现二者对 SE 抑菌效果好, MIC 分别为 6.3 μg/mL 和 3.1 μg/mL; Feng 等<sup>[15]</sup>采用隐丹参酮对临床 21 株金黄色葡萄球菌进行抑菌试验,得到隐丹参酮对 21 株菌的 MIC 为 4 ~ 64 μg/mL, 具有较好的抑菌效果。尽管已有隐丹参酮抑制细菌浮游菌生长的相关报道,但目前尚未见其抑制细菌生物膜形成的报道。故本研究选择隐丹参酮为靶药,观察隐丹参酮对 SE 生物膜不同成熟阶段的抑制效果,为丹参酮用于预防和治疗生物膜耐药 SE 感染的可能性提供实验依据。

生物膜是依附于某载体表面的,由胞外多聚物和基质包被的高度组织化、系统化的微生物膜性聚合物,其临床意义为不断释放膜内细菌造成感染迁延不愈。对于生物膜状态的致病菌,根据临床传统的抗菌药物敏感性试验所得到的抗菌药物治疗浓度已经完全不能控制此类感染。已有大量证据表明,杀死生物膜内细菌所用的抗生素浓度是杀死浮游菌所用抗生素浓度的 10~1 000 倍,因此,目前美国传染病协会提出了抗生素锁定技术 (antibiotic lock

technique, ALT)用于治疗生物膜引起的医疗植入物相关感染<sup>[16]</sup>。基于 ALT 的提出,目前许多研究者通过在体外建立生物膜模型,然后使用 10~1 000 倍 MIC 的抗菌药物作用于生物膜,观察药物清除生物膜所需的浓度及时间,以便更加准确地为临床指导用药。如 Lee 等<sup>[17]</sup>依据 ALT,发现 5 mg/mL 的万古霉素、5 mg/mL 的环丙沙星和 5 mg/mL 的利福平能够在 5 d 内清除 SE 生物膜。根据本课题组前期实验中用二倍稀释法测得隐丹参酮对 SE 的 MIC 为 2  $\mu$ g/mL,MBIC 为 32  $\mu$ g/mL,故本研究选择的低浓度隐丹参酮作用浓度为 32  $\mu$ g/mL(16 倍 MIC),高浓度隐丹参酮为 128  $\mu$ g/mL(64 倍 MIC),观察药物作用生物膜的剂量效应。同时,通过建立 SE 生物膜生长曲线,以确定细菌黏附、聚集和成熟各个阶段时间点,在不同时间点给予药物干预,从而更加全面、深入地探讨药物对其抑制效果。由于万古霉素是临床治疗葡萄球菌感染的最后一道防线,故本研究选择其为阳性对照药物。

本研究首次证明了隐丹参酮一定程度上能够抑制 SE 生物膜各个阶段基质形成、膜内菌代谢活性、破坏生物膜整体微观形态,且此抑制作用存在一定的剂量效应。随着生物膜成熟度的增高,高浓度的隐丹参酮抑制作用强于低浓度的隐丹参酮,甚至对于成熟生物膜结构,低浓度的隐丹参酮并不能发挥抑制作用,证实了细菌形成生物膜后耐药性会明显增强,临床必须使用高剂量的药物浓度才能达到控制生物膜感染的目的,也说明应进一步设置药物作用的浓度梯度,寻找抑制生物膜形成的药物浓度拐点,才能真正为隐丹参酮防治生物膜耐药的 SE 感染提供科学的、有价值的实验依据。

#### [参 考 文 献]

[1] Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in *staphylococci* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2: 38.

[2] 王政军,库里满·恰里甫,苗德艳,等. 丹参提取物抑菌活性的初步评价[J]. 食品工业与科技,2011,32(7):65-70.

[3] 李燕,李冬冬,宋琪,等. 4 种方法检测表皮葡萄球菌生物膜形成能力的应用价值探讨[J]. 中国实验诊断学,2011,15(3):424-427.

[4] 李燕,李冬冬,陶传敏,等. 表皮葡萄球菌生物膜形成及相关基因的检测及评价[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(4):473-476.

[5] Shao J, Cheng HJ, Wu DQ, et al. Antimicrobial effect of sodium houctuyfonate on *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* biofilms[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(6): 798-803.

[6] Zhu C, Tan H, Cheng T, et al. Human  $\beta$ -defensin 3 inhibits antibiotic-resistant *Staphylococcus* biofilm formation [J]. J Surg Res, 2013, 183(1): 204-213.

[7] Kadry AA, Fouda SI, Shibl AM, et al. Impact of slime dispersants and anti-adhesives on in vitro biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lenses and on antibiotic activities[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(3): 480-484.

[8] 官妍,马越,程惠娟,等. 苦参碱对表皮葡萄球菌生物被膜作用初探[J]. 微生物学通报,2011,38(1): 91-96.

[9] 官妍,李春,石晶金,等. 亚抑菌浓度鱼腥草素钠及与红霉素联合对表皮葡萄球菌生物被膜的作用[J]. 中国中药杂志,2013, 38(5):731-735.

[10] Dong Y, Chen S, Wang Z, et al. Synergy of ultrasound microbubbles and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilm[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(4): 816-826.

[11] Zeng X, Liu X, Bian J, et al. Synergistic effect of 14- $\alpha$ -lipoyl andrographolide and various antibiotics on the formation of biofilms and production of exopolysaccharide and pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6): 3015-3017.

[12] Pammi M, Liang R, Hicks JM, et al. Farnesol decreases biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin[J]. Pediatr Res, 2011, 70(6): 578-583.

[13] Lee DS, Lee SH, Noh JG, et al. Antibacterial activities of cryptotanshinone and dihydrotanshinone I from a medicinal herb, *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(12): 2236-2239.

[14] 周静,李惠芬,王洪志,等. 丹参水溶性成分与脂溶性成分抑菌作用的考察[J]. 时珍国医国药,2008,19(9):2130-2131.

[15] Feng H, Xiang H, Zhang J, et al. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cryptotanshinone[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, 2009: 617509.

[16] Akbari F, Kjellerup BV. Elimination of bloodstream infections associated with *Candida albicans* biofilm in intravascular catheters[J]. Pathogens, 2015, 4(3): 457-469.

[17] Lee JY, Ko KS, Peck KR, et al. In vitro evaluation of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections caused by *staphylococci*[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(6): 1110-1115.

(本文编辑:左双燕)