

聚乙烯界面结核分枝杆菌黏附力及生物膜的形成

熊庆广¹, 王永清¹, 赵志辉¹, 毕红宾², 孙晋保¹, 张庆杰², 郝晓辉¹, 李毅¹(¹天津医科大学第四中心临床学院, 天津市 300140;
²天津中医药大学, 天津市 300139)

文章亮点:

- 1 细菌黏附植入物界面并形成生物膜是关节置换后感染难治的重要原因。
- 2 课题组前期研究发现结核杆菌对钴铬钼、钛合金的黏附力低, 且极少形成生物膜, 可安全置入结核病灶, 但人工关节的聚乙烯内衬或衬垫置入结核病灶的安全性尚不明确。
- 3 实验创新性探讨了利福平干预前后, 结核杆菌对聚乙烯的黏附力及生物膜形成情况, 发现结核杆菌能黏附聚乙烯界面并形成生物膜, 但适宜浓度的利福平可抑制生物膜形成, 甚至破坏生物膜。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 聚乙烯; 钴铬钼; 结核分枝杆菌; 利福平; 关节结核; 生物膜

主题词:

聚乙烯; 钴铬钼合金; 分枝杆菌; 结核; 利福平

基金资助:

天津市卫生局科技基金项目(2013KY05)

摘要

背景: 研究证实结核杆菌对钴铬钼、钛合金的黏附力低, 且不形成生物膜, 但其对聚乙烯的黏附力及生物膜形成情况未见报道。

目的: 观察利福平干预对聚乙烯界面结核杆菌黏附力及生物膜形成的影响。

方法: 将聚乙烯和钴铬钼实验材料在无菌条件下分别置于 Middlebrook 7H9 液体培养基中, 与结核杆菌共同培养 2 周, 随机取出 2 块后, 再加入 1 mg/L 的利福平溶 2 mL, 继续培养 2 周后, 用激光共聚焦显微镜观测利福平干预前后材料界面单位面积菌落数及菌落厚度, 扫描电镜观察利福平干预前后材料界面细菌生物膜结构。

结果与结论: 利福平干预前, 聚乙烯界面单位面积菌落数及菌落厚度均大于钴铬钼组($P < 0.05$); 利福平干预后, 聚乙烯界面单位面积菌落数及菌落厚度较干预前明显减少($P < 0.05$)。利福平干预前, 聚乙烯界面可见结核杆菌黏附, 形成似“雪花状”、“云雾状”, 可见生物膜结构; 钴铬钼界面可见散在结核杆菌菌落, 未见生物膜结构形成。利福平干预后, 聚乙烯界面黏附菌落数减少, 部分结核杆菌出现干瘪、裂解, 生物膜有不同程度的破坏; 钴铬钼界面未见菌落形成, 偶见单个结核杆菌黏附, 未见生物膜形成。表明结核杆菌可在聚乙烯界面形成生物膜, 但利福平可抑制甚至破坏结核生物膜。

熊庆广, 王永清, 赵志辉, 毕红宾, 孙晋保, 张庆杰, 郝晓辉, 李毅. 聚乙烯界面结核分枝杆菌黏附力及生物膜的形成[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(52):8420-8425.

Adhesion ability and biofilm formation of *Mycobacterium tuberculosis* in the interface of polyethylene

Xiong Qing-guang¹, Wang Yong-qing¹, Zhao Zhi-hui¹, Bi Hong-bin², Sun Jin-bao¹, Zhang Qing-jie², Hao Xiao-hui¹, Li Yi¹ (¹Department of Orthopedics, the Fourth Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300140, China; ²Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have confirmed that there is no biofilm formation and lower adhesion ability of *Mycobacterium tuberculosis* in the interface of vitallium, but it has not been reported about biofilm formation and adhesion ability in the polyethylene.

OBJECTIVE: To observe the adhesion ability and biofilm formation of *Mycobacterium tuberculosis* on the polyethylene before and after rifampicin intervention.

METHODS: Under sterile conditions, polyethylene and vitallium samples were respectively placed in Middlebrook H7N9 culture medium to be co-cultured with *Mycobacterium tuberculosis* for 2 weeks. Then, two pieces of samples were taken randomly and cultured in 1 mg/L rifampicin (2 mL) for 2 weeks. The number of colonies and colony thickness in the unit area in the material interface were measured by confocal laser scanning microscope, and the structure of biofilms was observed by scanning electron microscope before and after rifampicin intervention.

RESULTS AND CONCLUSION: The colony thickness and the number of colonies in the unit area was

熊庆广, 男, 1988 年生, 江西省南昌市人, 汉族, 天津医科大学在读硕士, 主要从事骨与关节疾病的研究。

通讯作者: 王永清, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 博士生导师, 天津医科大学第四中心临床学院, 天津市 300140

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.52.011
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)52-08420-06

稿件接受: 2014-11-12

Xiong Qing-guang, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, the Fourth Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300140, China

Corresponding author: Wang Yong-qing, Professor, Chief physician, Master's supervisor, Doctoral supervisor, Department of Orthopedics, the Fourth Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300140, China

significantly more in the polyethylene group than in the vitallium group before intervention ($P < 0.05$), but after intervention, these two indexes were reduced significantly in the polyethylene group ($P < 0.05$). Before rifampicin intervention, *Mycobacterium tuberculosis* was adherent to the polyethylene interface in a snowflake-like or nebulous shape, and biofilm structure was visible; in the vitallium interface, there were scattered colonies of *Mycobacterium tuberculosis*, but no biofilm formation. After rifampicin intervention, the number of colonies adhered in the polyethylene interface was reduced, *Mycobacterium tuberculosis* appeared to be shriveled and cleaved partially, and the biofilms exhibited varying degrees of damage; in the vitallium interface, there were no colonies, but single *Mycobacterium tuberculosis* was occasionally adherent to the polyethylene interface, and there was no biofilm formation. These findings indicate that *Mycobacterium tuberculosis* can form a biofilm in the polyethylene interface, but rifampin can inhibit and even destroy the biofilm of *Mycobacterium tuberculosis*.

Subject headings: polyethylene; vitallium; *Mycobacterium tuberculosis*; rifampin

Funding: Science and Technology Foundation of Tianjin Bureau of Public Health, No. 2013KY05

Xiong QG, Wang YQ, Zhao ZH, Bi HB, Sun JB, Zhang QJ, Hao XH, Li Y. Adhesion ability and biofilm formation of *Mycobacterium tuberculosis* in the interface of polyethylene. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(52):8420-8425.

0 引言 Introduction

骨与关节结核是常见的肺外结核, 髌膝关节结核占25%–35%^[1], 其发病率逐年上升^[2-4]。关节结核引起的疼痛、骨质破坏、功能受限等严重影响患者日常生活, 给其治疗带来了严峻挑战, 外科手术是解除痛苦、重建功能、提高生活质量的可靠方法。人工关节置换治疗活动性关节结核虽可获得较好的临床疗效^[5-7], 但对在病灶内植入植入物是否会导致结核经久不愈或复发还心存疑虑。研究表明细菌生物膜与生物材料感染的发生、发展密切相关^[8-9]。Costerton^[10]认为抗生素只能杀灭浮游细菌, 无法消除生物膜内的细菌, 一旦停药或抵抗力下降, 生物膜内低活力的细菌会再次释放形成浮游细菌, 导致感染难治或复发。钴铬钼和钛合金作为目前人工关节的主要材料之一, 已有众多文献对结核杆菌和其他细菌对钛合金、钴铬钼的黏附性方面进行了深入探讨, 认为结核杆菌在钛合金、钴铬钼界面的黏附力低, 不形成生物膜, 不影响抗结核药物和机体正常免疫对其的杀灭作用^[11-12]; 越来越多的临床研究也证实钛合金、钴铬钼可安全置入结核病灶^[13-15]。

超高分子量聚乙烯是一种相对分子质量超过150万的工程塑料, 具有其他材料无法比拟的抗冲击性、耐磨损性、低摩擦系数、耐化学腐蚀性、耐低温性、耐应力、低吸水率、生物相容性及自身润滑性等生物性能, 已成为目前人工关节载荷元件胫骨平台垫片和髌臼内衬的首选材料。长期临床随访研究表明, 金属对聚乙烯组合的关节置换获得了良好临床疗效, 但其仍存在抗磨损性能方面的问题。魏召劝等^[16]通过回顾性研究表明, 采用高交联聚乙烯与传统聚乙烯髌臼内衬行髌关节置换在临床疗效上无显著差异, 但与传统聚乙烯髌臼内衬相比, 高交联聚乙烯髌臼内衬具有更好的抗磨损性能。虽然高交联聚乙烯的使用明显降低了人工关节假体的体内磨损率, 但仍存在磨损。研究表明磨损时产生的离子或碎屑导致局部不良的软组织反应和破坏, 调节免疫系统和细菌生长, 为细菌繁殖和感染病灶残留细菌的死灰复燃创造条件^[17-18]。目前聚乙烯

髌臼内衬、胫骨平台垫片的关节假体被广泛用于治疗髌膝关节结核疾患, 但尚缺乏结核杆菌对聚乙烯材料黏附力及生物膜形成的研究, 就其是否能安全置入结核病灶尚不确定。

本实验采用液体培养基模拟结核杆菌黏附植入物, 形成生物膜的过程, 并给予利福平干预, 通过计算结核杆菌在聚乙烯界面单位面积黏附菌落数及菌落厚度, 对其黏附力进行分析比较, 同时观察其界面生物膜形成情况, 并与钴铬钼对照, 探讨人工关节置换治疗活动性关节结核中聚乙烯部件的安全性问题, 为人工关节假体的选择提供参考。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 对比观察实验。

时间及地点: 于2014年1至8月在天津市疾控中心、南开大学电镜实验室完成。

材料: 结核杆菌标准株, 由天津市疾控中心提供; 聚乙烯、钴铬钼材料, 由天津市金兴达有限公司提供。

聚乙烯界面结核分枝杆菌黏附力及生物膜形成实验的试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
Middlebrook 7H9 液体培养基、改良罗氏培养基、利福平溶液	Sigma 公司产品
Live/Dead [®] BacLight [™] Bacterial Viability Kit	Invitrogen 公司, 美国
MRC-1024ES 型激光共聚焦显微镜	Bio-Rad 公司, 美国
FEI Quanta 200 型扫描电镜	FEI 公司, 荷兰

实验方法:

菌液制备: 取少量冻存结核杆菌, 接种于改良罗氏培养基中, 37 °C 恒温下培养2周后获得菌落, 取单个菌落接种于改良罗氏培养基中, 在37 °C 恒温下培养2周获得纯种菌液。采用倾注平板法^[1], 加生理盐水配成浓度为 10^{10} cfu/mL 的细菌备用。

材料处理与实验分组: 将聚乙烯和钴铬钼加工制成直径0.8 cm、厚0.2 cm的圆片各30块(与临床内固定物粗糙度

一致), 所有材料块经蒸馏水、洗涤污质后, 环氧乙烷熏蒸灭菌备用; 聚乙烯为实验组, 钴铬钼为对照组。

细菌黏附及生物膜实验: 将上述2种材料块各3块分别放入2个50 mL的无菌离心管, 每个离心管中依次加入Middlebrook 7H9液体培养基4 mL、细菌悬液1 mL混均, 在37 °C恒温下培养2周后, 从每支离心管中随机取出2块, 然后在每支离心管中加入2 mL质量浓度为1 mg/L的利福平溶液, 同样条件下继续培养2周后, 取出剩余材料块; 实验重复10次。将取出的材料块在激光共聚焦显微镜和扫描电镜下观察。

激光共聚焦显微镜观察: 将利福平干预前取出的聚乙烯和钛合金材料各1块, 无菌PBS冲洗3次。按照Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit说明书配制活/死细菌荧光染色剂; 加入荧光染液, 常温下染色20 min, 激光共聚焦显微镜下观察。每个材料块中随机取10个视野(10 μm×10 μm), 观察单位面积菌落数, 同时每个视野随机取1个菌落扫描测量其厚度。

扫描电镜观察: 将上述两时间点取出聚乙烯和钛合金材料各1块, PBS漂洗3次后, 经3%戊二醛固定, 1%四氧化锇固定, 体积分数30%–100%乙醇梯度脱水, 乙酸戊二酯置换, CO₂临界点干燥, 金离子溅射法镀膜处理后, 观察细菌生物膜表面结构。

主要观察指标: 各组菌膜共聚焦激光扫描显微镜分析和扫描电镜观察结果。

统计学分析: 采用SPSS 17.0软件包进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 利福平干预前, 不同植入物界面单位面积黏附菌落数及菌落厚度的比较, 采用两独立样本资料 t 检验; 利福平干预前后, 聚乙烯界面单位面积黏附菌落数及菌落厚度的比较, 采用配对资料 t 检验, 检验水准 α 值取双侧0.05。

2 结果 Results

2.1 激光共聚焦显微镜分析结果 利福平干预前, 实验组界面单位面积黏附的菌落数与菌落厚度多于对照组($P < 0.05$), 见表1。利福平干预后, 聚乙烯界面单位面积黏附菌落数及菌落厚度分别为(2.24±0.84)个、(0.74±0.22) μm, 均较干预前均明显减少($t=8.38, 4.45, P < 0.05$)。

2.2 扫描电镜观察结果 500倍视野下, 聚乙烯界面可见结核杆菌黏附, 形成似“雪花状”、“云雾状”, 且部分菌落间已融合成片状; 放大至5 000, 15 000倍, 可见大量结核杆菌聚集, 成为立体的、复杂的膜样结构, 结核杆菌周围可见“膜状”黏液样物质, 将细菌连接、包裹, 形成对“膜下”的细菌起保护作用的生物膜结构, 见图1A–C。500倍视野下, 钴铬钼界面可见散在结核杆菌菌落, 但未见融合; 放大至5 000, 15 000倍, 结核杆菌呈单个样黏附, 彼此之间不发生聚集、粘连, 未见生物膜结构形成, 见图2A–C。利福平干预后, 500倍视野下聚乙烯界面黏附菌落

表1 利福平干预前不同材料界面单位面积黏附菌落数及菌落厚度比较

Table 1 The thickness and number of colonies in the unit area of material surface before rifampicin intervention ($\bar{x}\pm s, n=10$)

材料	菌落数(个)	菌落厚度(μm)
聚乙烯	6.05±1.58	1.84±0.64
钴铬钼	2.16±1.24	0.83±0.19
t	6.12	4.80
P	< 0.05	< 0.05

数减少, 继续放大至5 000, 15 000倍, 部分结核杆菌出现干瘪、裂解, 生物膜有不同程度的破坏, 见图1D–F; 钴铬钼界面未见菌落形成, 偶见单个结核杆菌黏附, 未见生物膜形成, 见图2D–F。

3 讨论 Discussion

细菌黏附假体界面并形成生物膜是人工关节置换后感染难治的主要原因^[19]。关节假体植入后, 立即被各种小分子物质包裹, 可逆性黏附假体形成条件膜; 随后在非特异性因素作用下, 细菌附着于材料界面、条件膜, 其表面特有结构和分泌的胞外多聚糖物质, 与材料界面的特定位点产生受体-配体样特异性结合^[20], 最后细菌为适应环境及材料的刺激作用, 以极其精确、协调的步骤启动或关闭特定的基因表达, 克隆、分泌大量多糖-蛋白质复合物, 形成生物膜^[21]。由于结核杆菌的活动力差, 无鞭毛、荚膜等黏附配体, 其生物膜的形成不同于普通细菌; 国内外研究表明结核杆菌黏附假体界面是由多种蛋白质共同协作的复杂过程, 其自身分泌的黏附素是结核杆菌黏附生物材料界面的主要物质^[22-23], 在结核杆菌入侵、发病及传播等方面具有重要作用^[24]; 有文献报道菌毛可促进结核杆菌生物膜的形成。生物膜形成后可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。

目前, 国内外学者对活动性关节结核行一期关节置换的分歧主要是假体的存在是否增加结核复发的风险, 主要原因在于: 活动性关节结核的病程中, 尽管术前规律抗结核治疗、病灶清除使结核杆菌显著减少, 但病灶内不可避免仍有结核杆菌残留; 同时由于病灶周围血供减小、硬化骨的存在, 残留菌黏附植入物, 形成生物膜的机会明显增加且容易耐药, 最终导致手术失败。细菌主动黏附是生物材料相关感染的初始动因, 研究证实结核杆菌对常见关节假体材料钴铬钼、钛合金的黏附力显著低于其他细菌, 且极少形成生物膜^[11], 认为在结核病灶内植入钛合金、钴铬钼材料的假体是安全可靠的; 但目前尚缺乏聚乙烯内衬或衬垫能否置入结核病灶的安全性研究。因此, 研究结核杆菌对聚乙烯材料的黏附力及生物膜形成情况对探讨关节置换的安全性问题具有重要的意义。

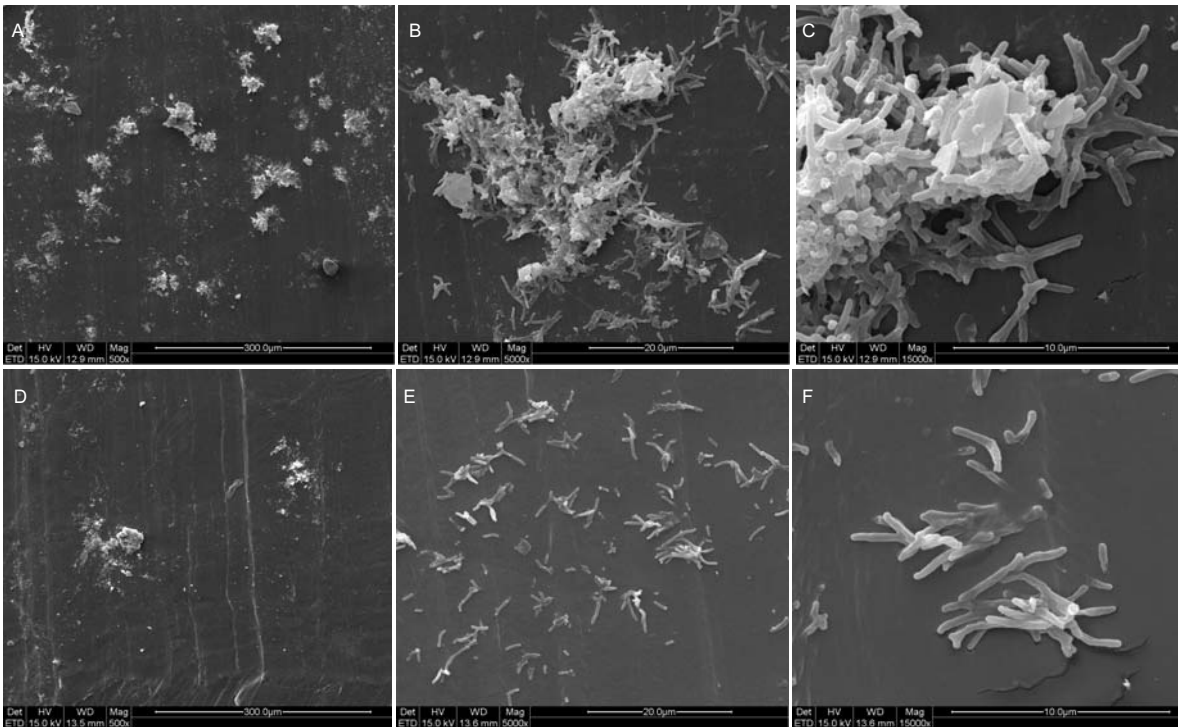


图 1 利福平干预前后聚乙烯界面结核杆菌黏附及生物膜形成情况(扫描电镜)

Figure 1 Adhesion and biofilm formation of *Mycobacterium tuberculosis* in the interface of polyethylene before and after rifampicin intervention (scanning electron microscope)

图注: 图中 A-C 为利福平干预前, 聚乙烯界面可见结核杆菌黏附, 形成似“雪花状”、“云雾状”菌落, 且部分已融合成片状, 结核杆菌周围可见“膜状”黏液样物质, 将细菌连接、包裹, 形成对“膜下”的细菌起保护作用的生物膜结构; D-F 为利福平干预后, 聚乙烯界面可见极少菌落黏附, 结核杆菌呈单个样黏附, 部分出现干瘪、裂解, 生物膜有不同程度的破坏。

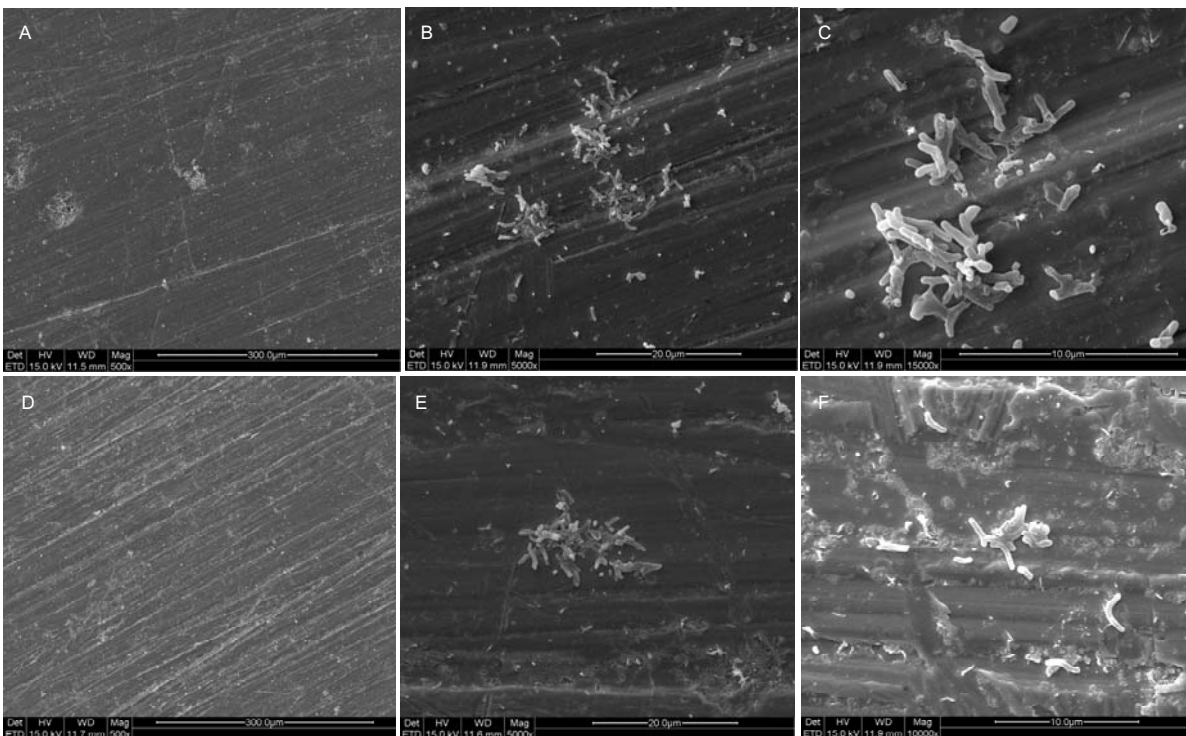


图 2 利福平干预前后钴铬钼界面结核杆菌黏附及生物膜形成情况(扫描电镜)

Figure 2 Adhesion and biofilm formation of *Mycobacterium tuberculosis* in the interface of vitallium before and after rifampicin intervention (scanning electron microscope)

图注: 图中 A-C 为利福平干预前, 钴铬钼界面见散在结核杆菌黏附, 未见明显生物膜形成; D-F 为利福平干预后, 钴铬钼界面见极少结核杆菌黏附, 未见生物膜形成。

研究表明结核杆菌在不同的生长时期, 其黏附情况变化较大, 是动态变化的过程, 培养至15-30 d时, 结核杆菌的黏附力最强、数量最多, 能准确反映结核杆菌的黏附力。根据结核杆菌的生长曲线, 作者采用液体培养基模拟结核杆菌黏附植入物, 形成生物膜的过程, 与材料共同培养4周, 并于培养至第2周时加入利福平干预, 通过计算结核杆菌在聚乙烯界面黏附面积对其黏附力进行观察, 同时研究其界面生物膜形成情况, 并与钴铬钼为对照, 以期为人工关节假体中聚乙烯部件的安全性提供实验依据。

实验用利福平是临床上治疗结核杆菌感染的常用药物之一, 其与依赖DNA的RNA多聚酶的 β 亚单位牢固结合, 阻止该酶与DNA连接, 阻断RNA转录过程, 干扰脱氧核糖核酸及蛋白质的合成^[25], 从而达到杀菌目的; 而且对耐药的各种结核杆菌变异菌株, 不管细菌代谢能力的强弱, 还是结核菌在细胞内或细胞外, 都表现很强的抑菌活力。Ojha等^[26-27]将结核杆菌置于离心管中培养5周后, 加入50 mg/L(相当于最低抑菌浓度的50倍)利福平溶液共同培养, 连续检测结核杆菌的活性, 结果表明结核杆菌的活性显著降低, 本实验中利福平的质量浓度为1 mg/L。

材料性质、细菌表面结构(鞭毛、菌毛、荚膜等)、基因调控等都会影响细菌生物膜形成。研究证实植入材料的性质及其界面的化学组成、自由能、表面电荷等会影响细菌的黏附, 从而影响生物膜的形成^[28-29]。目前, 普遍认为结核杆菌不会形成鞭毛、菌毛等结构, 但有研究证明Rv3312A基因可在结核杆菌表面表达类似的curli菌毛, 能强有力的黏附真核生物的细胞外基质蛋白层粘连蛋白, 促进结核杆菌的黏附及生物膜形成^[30-31]。鼠伤寒沙门氏菌的转录调控因子(RpoS)、双组分调控系统等能感受细菌外界的微环境变化, 并将其整合以信号的形式传递给影响生物膜形成的中枢调控子curli亚基因D, 从而控制其生物膜形成^[32-33]。国内外文献报道结核杆菌的生物膜形成相关基因较多, 各有其独特的结构功能, 抑制或促进生物膜的形成^[34-36]。研究表明, 聚酮合酶可催化产生多种脂质, 包括硫脂类、酚醛酯脂类(PGL)及其相关的结核菌醇二分支菌酸(PDIM)等, 在结核杆菌的免疫调节和毒力作用中扮演着重要作用; 结核杆菌的聚酮合酶蛋白Pks15/1基因对PGL的合成很有必要, 其中pks1基因以其特定方式促进结核杆菌生物膜的形成^[37]。此外, 细菌生物膜的形成还与细菌密度感应系统密切相关。随着细菌密度的增加, 细菌会产生并释放一种自体诱导物的信号分子, 并随细菌密度的增加而增加, 当自体诱导物积累到一定浓度时会改变细菌特定基因的表达, 细菌就通过感知信号调整其共同行为, 调控细菌生物膜形成^[38-39]。本实验结果表明, 结核杆菌大量黏附于聚乙烯界面, 并可见结核杆菌分泌黏液样物质, 将细菌之间、细菌与材料之间连接起来, 形成生物膜; 但利福平干预后, 聚乙烯界面单位面积黏附的菌落数和菌落

厚度显著减小, 其原因除与利福平本身具有杀结核杆菌的作用和聚乙烯本身物理特性有关, 还可能与利福平干扰Rv3312A基因的表达, 抑制菌毛形成或者pks1基因的表达, 从而减弱结核杆菌对聚乙烯的黏附力, 抑制生物膜形成。聚乙烯界面生物膜结构有不同程度的破坏, 除与结核杆菌的低黏附力等固有特性有关, 形成的生物膜与聚乙烯界面的黏附不够牢靠; 还可能与利福平作用于结核杆菌的密度感应系统, 与自体诱导物竞争性结合受体, 阻断结核杆菌的密度感应, 从而抑制甚至破坏生物膜, 但这些仅仅是猜测, 还有待进一步证实。

本实验发现结核杆菌对聚乙烯的黏附力显著强于钴铬钼, 但利福平可抑制甚至破坏结核生物膜, 认为在全身和局部抗结核的前提下, 聚乙烯内衬或衬垫置入结核病灶不会增加骨结核术后复发风险, 是安全可靠的。

作者贡献: 王永清、赵志辉、熊庆广进行实验设计, 实验实施及数据收集为熊庆广、赵志辉, 数据分析为毕红宾, 熊庆广成文, 王永清审核, 赵志辉对文章负责, 其他作者均参与实验。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 超高分子量聚乙烯是一种相对分子质量超过150万的工程塑料, 具有其他材料无法比拟的抗冲击性、耐磨损性、低摩擦系数、耐化学腐蚀性、耐低温性、耐应力、低吸水性、生物相容性及自身润滑性等生物性能, 已成为目前人工关节载荷元件胫骨平台垫片和髌白内衬的首选材料。长期临床随访研究表明金属对聚乙烯组合的关节置换获得了良好临床疗效, 但其仍存在抗磨损性能方面的问题。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Chocholac D, Kala B, Gallo J, et al. Evaluation of treatment outcomes in tuberculosis of knee and hip joints in 2005-2012. Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 2013; 80(4): 256-262.
- [2] De Haan J, Vreeling AW, Van Hellemond G. Reactivation of ancient joint tuberculosis of the knee following total knee arthroplasty after 61 years: a case report. Knee. 2008; 15(4): 336-338.
- [3] Furia JP, Box G, Lintner DM. Tuberculous arthritis of the knee presenting as a meniscal tear. Am J Orthop (Belle Mead NJ). 1996; 25(2): 138-142.
- [4] Neogi DS, Yadav CS, Ashok K, et al. Total hip arthroplasty in patients with active tuberculosis of the hip with advanced arthritis. Clin Orthop Relat Res. 2010; 468(2): 605-612.
- [5] 王永清, 毕红宾, 赵志辉, 等. 晚期活动性全髋关节结核一期病灶清除全髋关节置换术的中远期疗效[J]. 中华骨科杂志, 2013, 33(9): 895-900.
- [6] Wang Y, Wang J, Xu Z, et al. Total hip arthroplasty for active tuberculosis of the hip. Int Orthop. 2010; 34(8): 1111-1114.
- [7] 张晓岗, 任姜栋, 曹力, 等. 一期全髋关节置换术治疗晚期活动性髋关节结核[J]. 中华骨科杂志, 2013, 33(1): 8-13.

- [8] Finlay B, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61(2):136-169.
- [9] 毛彦杰, 沈灏, 蒋垚. 生物膜与人工关节假体感染关系研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(12):1463-1467.
- [10] Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;(437):7-11.
- [11] 马骏, 李国庆, 曹力. 结核杆菌黏附不同人工关节假体材料的能力研究[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(47):8807-8812.
- [12] 周劲松, 陈建庭, 金大地, 等. 结核分枝杆菌对材料粘附能力的体外实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(11):26-29.
- [13] 张宏其, 郭超峰, 唐明星, 等. 一期后路病灶清除、异形钛网椎间植骨融合治疗胸、腰椎结核[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(2):102-108.
- [14] 赵晨, 蒲小兵, 周强, 等. 后路病灶清除、椎间植骨融合内固定治疗复杂性胸、腰椎结核[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(2):109-115.
- [15] 黄迅悟, 冯会成, 孙继桐, 等. 活动性髋关节结核一期病灶清除全髋关节置换28例报告[J]. 中华骨科杂志, 2013, 33(5):495-500.
- [16] 魏召劝, 孙俊英, 查国春, 等. 采用高交联聚乙烯与传统聚乙烯髋臼内衬行人工全髋关节置换的比较研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2013, 27(12):1414-1418.
- [17] Judd KT, Noiseux N. Concomitant infection and local metal reaction in patients undergoing revision of metal on metal total hip arthroplasty. *Iowa Orthop J.* 2011; 31:59-63.
- [18] Hosman AH, Van Der Mei HC, Bulstra SK, et al. Effects of metal-on-metal wear on the host immune system and infection in hip arthroplasty. *Acta Orthop.* 2010; 81(5):526-534.
- [19] Schildhauer TA, Robie B, Muhr G, et al. Bacterial adherence to tantalum versus commonly used orthopedic metallic implant materials. *J Orthop Trauma.* 2006;20(7):476-484.
- [20] Finlay B, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61(2):136-169.
- [21] Arnold WV, Shirliff ME, Stoodley P. Bacterial biofilms and periprosthetic infections. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(24):2223-2229.
- [22] 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*. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011; 36(2):103-108.
- [23] 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.
- [24] Sanz J, Navarro J, Arbués A, et al. The transcriptional regulatory network of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2011;6(7):e22178.
- [25] 黄良库, 徐涛, 唐进, 等. 夫西地酸钠联合利福平对表皮葡萄球菌体外培养生物膜的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(21):3891-3894.
- [26] Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol.* 2008;69(1):164-174.
- [27] Kulka K, Hatfull G, Ojha AK. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms. *J Vis Exp.* 2012;(60):pii: 3820.
- [28] Grivet M, Morrier JJ, Benay G. Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *J Mater Sci Mater Med.* 2000;11(10):637-642.
- [29] Quitynen M, Bollen M. The influence of surface roughness and surface free energy on supra and subgingival plaque formation in man: A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995;22(1):1-14.
- [30] Ramsugit S, Guma S, Pillay B, et al. Pili contributes to biofilm formation in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2013;104(5):725-735.
- [31] Alteri CJ, Xicohtencatl-Cortes J, Hess S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(12):5145-5150.
- [32] Gerstel U, Park C, Romling U. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol Microbiol.* 2003;49:639-654.
- [33] Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, et al. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol.* 2005; 58:1322-1339.
- [34] 刘霞, 郭庆龙, 王若琚, 等. 结核分枝杆菌生物膜形成相关基因的筛选与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(4):15-21.
- [35] Pang JM. Genetics of biofilm maturation in *Mycobacterium tuberculosis*. University of Washington, 2011.
- [36] 王星. 表皮葡萄球菌和分枝杆菌生物膜相关基因的鉴定和功能研究[D]. 复旦大学, 2012.
- [37] Pang JM, Layre E, Sweet L, et al. The polyketide Pks1 contributes to biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 2012;194(3):715-721.
- [38] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: The Lux R-Lux I family of density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 1994; 176(2):269-275.
- [39] Dickschat JS. Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep.* 2010; 27(3):343-369.