

细菌生物被膜耐药机制研究进展*

胡辰晨, 刘红玲, 史蓉蓉, 许化溪, 苏兆亮[△] (江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏镇江 212013)

【关键词】 生物被膜; 耐药; 防治

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.060

中图分类号:R453.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)23-2659-03

细菌耐药已经成为临床抗生素治疗的棘手问题。研究表明,细菌生物被膜的形成与其耐药性有密切联系。细菌在生长过程中,为适应环境的改变,附着于固体表面而以特殊的“被膜”形式存在,使自身得到保护,逃逸机体免疫防御和抗菌药物的杀伤作用,致使感染迁延不愈和反复发作。

1 生物被膜的概念

细菌生物被膜(bacterial biofilm, BBF)或称为菌膜,是细菌为适应自然环境,在生长过程中不可逆地附着于固体表面而形成的特殊存在形式^[1]。细菌吸附于惰性物体如医学辅材或机体黏膜表面后,被自身细胞分泌的基质包被,基质中的多糖、纤维蛋白、脂蛋白等多糖复合物使细菌相互黏连并将其自身克隆聚集缠绕其中形成的膜样物。

2 细菌生物被膜的形成过程

2.1 细菌生物被膜的初步形成 细菌和基底层之间通过范德华力、疏水作用力、非特异性静电引力相互黏附;此外,细菌表面特定的黏附素与受体也可以相互作用,促进细菌黏附。进而细菌分泌多糖蛋白复合物与基底层牢固结合。在此阶段,由于缺乏成熟的细菌生物被膜的结构保护,细菌耐药性较弱。

2.2 细菌生物被膜的发展 细菌黏附到表面后,在生长过程中分泌大量的胞外多糖。胞外多糖可黏结单个细菌形成细菌团块,即微菌落,大量微菌落使细菌生物被膜加厚。此阶段,生物被膜趋于成熟,细菌耐药性增强^[2]。

2.3 细菌生物被膜的成熟 成熟的细菌生物被膜形成高度有组织的结构,该结构具有不均质性。其水份含量高达 97%,既含有蛋白质、多糖等生物大分子物质,还含有细菌分泌的营养物质、代谢产物及细菌裂解产物。其基本结构由蘑菇样单位组成,可分为根部、茎部、头部 3 个部分(见图 1)。彼此之间都能形成水通,用于输送营养物质及排泄废物,以满足细菌生存需要。每个亚单位的结构骨架为胞外多糖纤维或多糖蛋白质复合体纠缠在一起形成的实心细条,交错成网状。细菌生物被膜的这种特殊结构坚实稳定,大大提高了其存活能力^[3]。

3 细菌生物被膜形成的调控机制

3.1 基因水平的调控 研究表明,生物被膜的形成与多种基因密切相关。如铜绿假单胞菌生物被膜基因的表达与一般浮游菌相似,但有 1% 的基因表达与浮游菌不同,其中 0.5% 的基因被激活,0.5% 的基因被抑制。*nox* 基因是铜绿假单胞菌胞外基质中多聚葡萄糖合成的必需基因,该基因的变异株可以形成结构特异的生物被膜,这可能是由于缺乏多聚葡萄糖对药物作用位点的阻断所致^[4]。白假丝酵母菌生物被膜在形成过程中,其抗生素外排泵的基因表达高于浮游菌。粪肠球生物被膜

菌形成与 *esp*、*ebpA*、*gelE*、*fsrB* 基因密切相关^[5]。

3.2 分子水平的调控 在影响细菌生物被膜形成的众多因素中,研究较多的是生物被膜内部传感效应(Quorum sensing, Qs)^[6]。传感效应的调节是指同种或不同种细菌对它们当前所处环境、群体密度的感知、交流和反应的一种方式,当环境改变如细菌密度改变或营养条件变化时,细菌表面产生和分泌某种特定的信号分子,称为信息激素或自身诱导素,进而引发一系列的调节^[7-8]。已知有 5 类信息激素: AHL (acyl homoserine lactones)、PQSs (heptyl-hydroxy-quinolones)、Al-2、循环二肽(cyclic dipeptide)和寡肽(oligopeptide)参与 Qs。目前研究最多的是常见于革兰阴性菌的 LuxR-LuxI 系统^[8]。

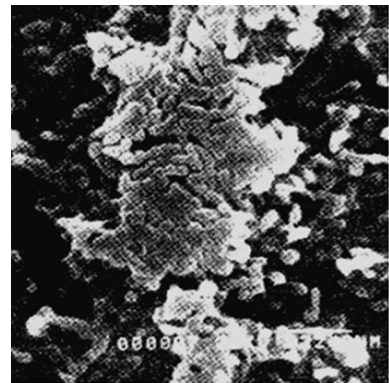


图 1 大肠埃希菌生物被膜扫描电镜(5 000×)

4 细菌生物被膜的耐药机制

4.1 生物被膜的渗透屏障作用 生物被膜是限制抗生素进入菌体的天然屏障。其胞外多糖的渗透屏障可以有效地阻止一些大分子蛋白酶、补体和一些较小的抗生素多肽进入^[9]。渗透屏障不仅降低了进入生物被膜内的抗生素的浓度,同时可以协助 β 内酰胺酶破坏抗生素分子。屏障限制和酶降解协同作用,使得生物被膜耐药性大大增加。研究还发现,胞外多糖带正电荷,而氨基糖甙类也带正电荷,这使得在物理机械屏障和化学灭活作用外又多了一层电荷屏障,使渗透更难进行。但是,在许多情况下,胞外多聚物并不能完全阻止抗生素进入生物被膜,而只能延长其渗透时间。

4.2 生物被膜内部环境的改变 细菌生物被膜的典型特点就是营养物质浓度的微阶梯梯度,此特点同其抗药性息息相关。不少研究显示,生物被膜内细菌由于营养供给受限或缺氧而成为导致细菌产生耐药的重要原因^[10]。由于营养缺乏,膜内部的细菌生长缓慢;氧气在生物被膜内被消耗,造成被膜深部的

厌氧环境,氨基糖苷类抗生素在厌氧环境下对细菌的作用明显低于有氧环境;酸性代谢产物的积累导致膜内外 pH 值有显著差异,渗透压的改变引发渗透压压力反应,使细菌外膜蛋白的比例改变,细胞被膜对抗生素的渗透性降低,这些因素均使生物被膜细菌进入非生长状态,产生耐药^[11-12]。

4.3 生物被膜基因的表达 目前发现很多与生物被膜细菌耐药性有关的基因,如 *hipAB*、*vlzcS*、*mar*、*sulA* 和 *relA* 等。Drenkard 等发现铜绿假单胞菌中存在一种调控该菌相位变异的蛋白质 (phenotype variant regulator, PvrR),该蛋白控制铜绿假单胞菌对抗生素敏感和耐药的转化,其相应基因 *PvrR* 在生物膜细菌中转录活跃,抑制或激活 *PvrR* 对铜绿假单胞菌生物被膜耐药性意义重大^[13]。Whiteley 等还发现,铜绿假单胞菌生物膜中 *tolA* 基因高度表达,而 *tolA* 基因的产物会影响脂多糖的结构,使得氨基糖苷类药物与细菌外膜的结合能力下降。这些基因的发现,对今后深入了解生物被膜的耐药机制及防治生物被膜相关疾病具有极其重要的意义^[14-15]。

4.4 细菌传感效应 不同的细菌以及所用抗生素的种类不同,Qs 在耐药性中的作用也有所不同。Davies 等发现铜绿假单 *lasR-lasIQs* 突变株不能形成正常结构的生物被膜且对 SDS 敏感性增加^[16];但是,Brooun 等实验结果显示铜绿假单胞菌 Qs 突变株对清洁剂和抗生素没有影响^[17];最近 Jeremy 等报道金黄色葡萄球菌 Qs 突变株对利福平敏感,对苯唑西林不敏感,而该突变株的浮游菌对利福平的敏感性亲代相比无显著差异^[18]。因此,Qs 系统的耐药机制有待进一步研究。

4.5 生物被膜独特表型的产生 细菌在与医学辅料黏附并聚集时可能被诱导产生一种膜独特表型,识别在膜内被激活或抑制的基因,对抗生素的杀伤作用^[19]。外排泵是浮游菌抗生素耐药的机制之一,Brooun 等对 *MexAB-OprM* 泵缺失和超表达铜绿假单胞菌对氧氟沙星的敏感性研究发现,在低浓度氧氟沙星下,外排泵缺失株生物被膜对氧氟沙星的敏感性高于超表达株^[20]。在抗生素选择压力作用下,细菌改变外膜蛋白 (Omps)尤其是膜上微孔蛋白 (porin) 的组成和数量,使菌体外膜通透性降低,阻碍抗生素进入菌体内而产生耐药性。例如,大肠埃希菌的微孔蛋白主要有 *OmpF* 和 *OmpC* 等,其中 *OmpF* 与抗菌药物的通透性相关,如果它在表达水平上发生变化甚至缺失,导致通透性降低,使得抗菌药物不能进入细胞内,从而导致细菌产生耐药性。

5 细菌生物被膜造成的感染

随着医学技术的日新月异,使得医源性生物被膜感染的比例越来越高,由于细菌生物被膜的存在,使被膜内细菌能够逃逸抗菌药物的杀伤作用和机体免疫系统的清除,成为潜在的感染源,在免疫力下降或其他诱因条件下被膜内细菌大量繁殖,从而造成感染的反复发作^[21]。细菌生物被膜相关感染主要包括以下 2 个方面。

5.1 生物被膜病 (biofilm disease) 或菌膜病,1990 年由日本小林宏行教授发现并提出,常见者如表 1。

5.2 生物医学材料相关感染,它的发病有逐年上升的趋势;根据流行病学调查,导尿管相关泌尿系统感染发生率为 92.3%,心外科人工瓣膜置入术合并感染发生率为 33.3%,机械通气患者气管插管处 90% 有细菌定植并反复发生感染;此外,大静脉导管、伤口引流管、人工关节置入等相关感染的发生率亦较高。

5.3 生物被膜造成感染的特点 (1)静止期和发作期的相互转化,病程慢性迁延;(2)抗菌药物治疗起初可能有效,但以后治疗常常失败;(3)致病菌主要来自皮肤和周围环境,其主要有金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、假单胞菌属、表皮葡萄球菌等^[22]。

5.4 细菌生物被膜的预防 (1)生物被膜前控制:重在预防,选择足够剂量且敏感的抗生素,不使疾病转入慢性期形成生物被膜;选用低表面能的医用材料,尽量不要使医疗器械留置体内。(2)生物被膜形成过程中控制:浮游菌→定植过程的阻断,抑制生物被膜的黏附。诱导细菌生物被膜附着所必需的鞭毛、菌毛等连接性细胞器,使其突变使之无法附着聚集。对各种常见的医用导管进行改进也可以有效预防细菌黏附,克隆及定植。亚抑菌药物浓度的抗生素能抑制初始阶段黏附在医疗器械上的细菌及其生物被膜。定植→形成生物被膜过程的阻断,降解生物被膜的细胞外基质或运用噬菌体抑制细菌的生物被膜的生长。此外还可以使用生物被膜抑制剂的研究表明,克拉霉素等大环内酯类、林可霉素等具有抗藻酸盐作用,可在菌膜上形成孔穴,进入菌膜内层,抑制生物被膜的形成。临床上联合使用小剂量的大环内酯类药物与对生物被膜通透性较强的氟喹诺酮类药物治疗生物被膜相关的感染,取得了很好的疗效。寻找和使用促进生物被膜分解的药物和制剂。目前认为,氟喹诺酮类加大环内酯类/磷霉素是目前最有效的治疗生物被膜菌感染的方案^[23]。(3)生物被膜屏障作用的阻断:一些抗生素如多粘菌素通过破坏细菌细胞包膜的完整性,增加膜的通透性而达到抗菌作用。人们已经知道多种能增加膜通透性的化合物,包括些常用的抗生素如氨基糖苷类和大环内酯类抗生素。

表 1 生物被膜病与相应细菌

BBF 感染疾病	形成生物被膜的细菌
牙髓	产酸革兰阳性球菌(如链球菌)
牙周炎	革兰阴性厌氧口腔细菌
中耳炎	非典型性流感嗜血杆菌
肌肉骨骼感染	革兰阳性球菌(如葡萄球菌)
弥漫性泛细支气管炎	铜绿假单胞菌
胆道感染	大肠埃希菌
骨髓炎	混合细菌感染和真菌
细菌性前列腺炎	大肠埃希菌和其他革兰阴性菌
心内膜炎	绿色链球菌
肺囊性纤维化	铜绿假单胞菌

6 展 望

细菌生物被膜的研究使微生物学的发展迈出了重要的一步,即认识到微生物可以以多细胞的生命形式存在,并引导人们去认识微生物是如何形成一具有结构性、协调性和功能性的高度组织群体。但是,细菌生物被膜内细菌的耐药机制目前还没有一个明确的解释,细菌生物被膜形成机制、形成过程中所需的条件和信号、细菌群体的功能性分工都需要进一步研究。

参考文献

[1] Cerca N, Martins S, Pier GB. The relationship between in-

- hibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm[J]. Res Microbiol, 2005, 156(5-6): 650-655.
- [2] Stoodley H, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(2): 95-108.
- [3] Chen X, Stewart PS. Biofilm removal caused by chemical treatments [J]. Water Research, 2000, 34 (17): 4229-4233.
- [4] 陈秋云, 韩北忠, 李春雷. 金黄色葡萄球菌生物被膜在不锈钢表面的形成及其对二氧化氯的敏感性[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4): 10-13.
- [5] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation [J]. J Microbiol Methods, 2000, 40(2): 175-179.
- [6] Dickschat JS. Quorum sensing and bacterial biofilms [J]. Nat Prod Rep, 2010, 27(3): 343-369.
- [7] Harvey J, Ketenan KP, Gilmour A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains[J]. Food Microbiol, 2007, 24(4): 380-392.
- [8] Bremer PJ, Fillery S, McQuillan AJ. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms [J]. Int J Food Microbiol, 2006, 106(3): 254-262.
- [9] Kuchma SL, O'Toole GA. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression[J]. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11: 429-433.
- [10] Donalan RM. Biofilms, microbial life on surfaces [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 881-890.
- [11] Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus* of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilm[J]. J Infect Dis, 2005, 191(2): 289-298.
- [12] Moons P, Michiels CW, Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms [J]. Crit Rev Microbiol, 2009, 35(3): 157-168.
- [13] Estrela AB, Heck MG, Abraham WR. Novel approaches to control biofilm infections [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(12): 1512-1530.
- [14] Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease [J]. Braz J Infect Dis, 2008, 12(6): 526-530.
- [15] Pitts B, Hamilton MA, Zelter N. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal [J]. J Microbiol Methods, 2003, 54(2): 269-276.
- [16] 段韵涵, 韩北忠, 杨葆华. 培养条件对金黄色葡萄球菌生物被膜生长的影响[J]. 中国酿造, 2008, (3): 17-20.
- [17] McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview [J]. Adv Appl Microbiol, 2009, 69: 99-132.
- [18] Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review [J]. Trends Microbiol, 2009, 17(2): 73-87.
- [19] Jakubovics NS. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms[J]. Mol Oral Microbiol, 2010, 25(1): 4-14.
- [20] Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics [J]. FEMS Microbiol Rev, 2010, 23: 280-287.
- [21] Pittet D, Vaudaux P, Sax H, et al. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis* [J]. Ann Med, 2009, 41(2): 109-119.
- [22] 屈常林, 高洪, 赵宝洪, 等. 细菌生物被膜与抗生素耐药机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(3): 251-254.
- [23] Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses [J]. J Dent Res, 2010, 89(3): 205-218.

(收稿日期: 2010-07-13)

肝干细胞研究进展

张瑞林, 赵昌芹 综述, 刘 备 审校(第三军医大学学员旅十一队, 重庆 400038)

【关键词】 肝干细胞; 肝; 免疫耐受

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.061

中图分类号: R657.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)23-2661-04

当前原位肝移植是治疗终末期肝病的最有效的措施, 但肝源严重短缺, 导致许多患者未能获得肝移植以及其费用昂贵、移植排斥反应及长期应用免疫抑制剂引起并发症等成为限制其广泛应用的主要原因。肝干细胞是一类具有自我更新与增殖分化能力的细胞, 能产生表现型与基因型和自己完全相同的子细胞, 同时还能分化为肝祖细胞, 并在动物实验和临床研究中均取得了显著进展。为众多急慢性肝损伤、肝代谢性疾病的患者带来了新的希望。同时, 也应清醒的认识到, 从肝干细胞基础研究到广泛临床应用仍有诸多问题需要认识和解决。现

就肝干细胞的研究进展作一综述。

1 来源与分布

肝源性肝干细胞包括胎肝干细胞、肝卵圆细胞(hepatic oval cell, HOC)。Suzuki 等^[1]采用荧光激活细胞分类法从小鼠胎肝中分离到一种增殖能力很强的细胞, 体外培养可形成较大的集落, 体外存活时间也大为延长, 提示小鼠胎肝中存在高增殖潜能的肝干细胞。Malhi 等^[2]从人胎肝中分离出一种上皮祖/干细胞, 它具有很强的集落形成能力。在培养条件下可增生数月, 且细胞分裂 40 次以上后仍能保持正常核型, 在联合免