

生物被膜分散方式的研究进展*

董成亚 马小彤**

(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所血液病医院实验血液学国家重点
实验室 天津 300020)

摘要:临床上生物被膜与感染的慢性迁延不愈密切相关,而生物被膜菌的分散又会造成感染的反复急性发作,给临床感染的有效控制带来很大困难。生物被膜菌的分散过程受到了遗传和环境等多因素的调控,主要是通过蜂式分散、块式分散和毯式分散3种形式来实现的。深入进行生物被膜基础研究对改变目前临床感染治疗的窘境有重大意义。

关键词:生物被膜,分散方式,感染

中图分类号:R117 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654 (2005) 06-0120-04

Advance in Biofilm Dispersal Strategies*

DONG Cheng-Ya MA Xiao-Tong**

(National Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300020)

Abstract: Bacterial biofilm is responsible for a wide variety of nosocomial infections. Many chronic infectious diseases are closely correlated with biofilm formation in the clinic. As the biofilm growth, bacterial clusters detachment and dispersal from mature mixed-species biofilms will result in repeated acute infections. Here reviews three distinct biofilm dispersal strategies: swarming dispersal, clumping dispersal and surface dispersal. Many factors, such as heredity and increased fluid shear in the environment, contribute to this complex and dynamic process. Fundamental investigation upon biofilm will benefit clinical therapy of biofilm-associated infections.

Key words: Biofilm, Dispersal strategies, Infection

临床上有一个很容易被忽视的事实:在人类感染性疾病中60%以上是细菌以生物被膜方式引起的^[1]。生物被膜菌能更有效逃逸抗生素和机体防御系统的清除,临床上表现为难治的慢性迁延不愈的感染,而生物被膜的分散又可使病菌不断扩散,导致感染的反复急性发作,给临床感染控制工作带来很大难度。不仅如此,在日常生活中生物被膜细菌还可污染与人类生活相关的设施如食品加工设备、供水系统和空调系统等,生物被膜菌的分散由此会造成传染病的流行^[2]。

生物被膜相关理论是1978年由Costerton等人首次提出的。一直以来研究的重点是细菌如何黏附到物体表面以及如何形成生物被膜,形成生物被膜后细菌的分散方式是近两三年来研究的新动向。本文拟对生物被膜分散策略的几种方式做一综述,为临床感染病因学的研究提供参考。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30471964)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No. 30471964)

** 通讯作者 Tel: 022-27307940-3053, E-mail: ma_xt@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-03-04, 修回日期:2005-04-19

1 生物被膜的一般概念

细菌生物被膜 (bacterial biofilm), 国内也有学者译为生物膜, 是指细菌黏附于惰性或者活性实体表面, 繁殖、分化并分泌大量胞外多聚基质 (exopolymeric matrix) 包裹其外形成的微菌落 (microcolony) 聚集体^[3]。任何细菌在成熟条件下都可以形成生物被膜。生物被膜是微生物的王国, 单个生物被膜可由同种或不同种微生物形成。现在已知生物被膜可在生物医学材料表面如植入的各种导管、人工心脏瓣膜和人体组织表面如牙齿、牙龈、支气管、尿道等形成。

随着菌种、附着表面、营养条件和周围环境的不同, 生物被膜菌在繁殖时形成了厚薄不等、疏密不一的结构。但是相比浮游状态下的同一菌株, 生物被膜中的细菌对抗菌药物抵抗力增强, 其原因可能是: ① 生物被膜形成的特有结构—多糖复合物层 (exopolysaccharide, EPS) 可阻止抗菌物质的渗入, 并能结合、滞留一部分抗菌药物而削弱其杀菌作用。② 生物被膜内部是一个低营养物质、低氧分压及高代谢产物的微环境, 大多数细菌处于 G_0 期, 一部分细菌可进入一种类似芽孢菌的分化状态, 对抗生素具有高度抗性。③ 单个生物被膜中可有多种微生物共生, 彼此具有协同保护作用, 如产生 β -内酰胺酶的菌种可保护不产生此酶的微生物免遭青霉素杀伤^[3]。

2 生物被膜分散方式 (biofilm dispersal strategies)

生物被膜菌的分散是个复杂的动态过程, 受到遗传基因 (主动因素)、周围环境 (被动因素) 等多因素的调控^[4]。生物被膜菌在形成成熟的生物被膜结构后, 启动某些特定基因的表达和 (或) 所处环境中流体剪切力的改变都可能会引起细菌的扩散。从目前研究情况来看主要存在以下 3 种方式:

2.1 蜂式分散 (swarming dispersal) 铜绿色假单胞菌借助其菌体表面特有的黏附素、表面结合蛋白与物体表面相应受体识别黏附后, 在生长繁殖的同时分泌大量胞外多糖物质 (EPS), 胞外多糖粘结单个细菌形成微菌落。生物被膜进一步成熟后微菌落的外层细菌分化成一外层壁, 称为生物被膜表型 (biofilm phenotype); 微菌落的内部除一些共生的浮游表型 (planktonic phenotype) 菌外, 大部分是具有第三表型 (a third phenotype) 的生物被膜菌, 这些生物被膜菌死亡、液化, 透射电镜 (TEM) 可见一个大的透光腔。外层壁中胞外多糖 (EPS) 在内源性水解酶作用下发生原位酶解, “能动”的浮游表型细菌泳出微菌落, 留下了一个中空的蘑菇状生物被膜空壳^[5,6]。生物被膜中怎么会出现浮游表型菌呢? 有人认为可能是生物被膜菌发生基因改变而来^[7]; 还有人则认为它可能是生物被膜细菌的一个亚群, 称为抗凋亡“长寿”菌^[8]。Webb 等人在铜绿色假单胞菌的连续培养装置的流出液中检测到一种能融解外层生物被膜表型菌的抗菌素, 他们还发现丝状噬菌体 (Filamentous phage, Pfl) 以噬菌体原形式存在于铜绿色假单胞菌基因组中并介导参与了第三表型菌的死亡和融解^[9]。无独有偶, Mai-Prochnow 在海洋生长的一种生物被膜菌海樽类被囊动物 (*Pseudoskinnera tunicata*) 中也观察到这种现象, 所不同的是发现该菌编码产生一种有毒的分子量为 190kD 的蛋白 AlpP, 生物被膜菌的死亡和液化就是由这种蛋白介导的^[10]。此外, 在不运动的牙齿病原菌共生放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 中也观察到这种分散方式, Kaplan 认为生物被膜菌落内新出现的一个特殊群体—非聚集菌 (nonaggregated cells)

对生物被膜分散极为重要,认为这些细菌的形成就是为了从菌落中释出,而缺乏非聚集菌的突变株细菌就不会发生生物被膜分散^[11]。在蜂式分散中有些细菌从微菌落中释出的动力是靠细菌自身运动,如铜绿色假单胞菌;而共生放线杆菌则可能是利用了连续培养装置中产生的热的对流^[4]。

2.2 块式分散 (clumping dispersal) 在环境中大小不一的剪切力的作用下,生物被膜上脱落下各种大小的团块。其中单个细菌和 10 个细菌以下的小团块常见 (占脱落总团块数的 90%),而大团块虽少见 (占脱落总团块数的 10%) 却包含了 60% 的总脱落生物量^[12]。团块是由胞外多糖包裹生物被膜细菌组成。细菌团块从生物被膜脱落的直接证据来自显微镜观察的培养生物被膜流出液。这些大小不等的细菌团块从生物被膜脱落后进到血液、淋巴液、组织液中,这些体液中含有适合细菌生长的营养成分,而且有试验证明脱落团块本身很可能具有抵抗宿主防御系统和抗菌药物的自我保护功能^[12]。因此,当体液中含有细菌时,随着周身循环,这些细菌就有可能在人体受损组织表面或放置的生物医学材料上形成生物被膜。有报道从生物被膜上脱落的单个团块中细菌数可达 1.6×10^3 ,在 *E. coli* 中远高于临床感染剂量;毒力强的菌株在免疫力低下的个体低至 10 个细菌数即可导致感染^[12]。从生物被膜上脱落的细菌团块的入血、再黏附有可能解释与该病原菌有关的感染转移、急性发作以及感染迁延不愈。

2.3 毯式分散/表面分散 (surface dispersal) 在生物被膜中不仅单个细菌靠菌毛或鞭毛能在黏附表面上运动,而且有证据表明整个生物被膜在剪切力作用下也能在黏着表面上运动^[13]。在奈瑟菌 (*Neisseria subflava*) 形成生物被膜的连续培养装置中观察到螺旋桨形状的源自成熟生物被膜的卫星菌落的生长,这些卫星菌落就是沿剪切力方向以表面分散方式生长的^[14]。在铜绿色假单胞菌形成的生物被膜中也观察到表面分散。临床上,气管内形成的生物被膜顺气道的向下流动就可能与肺内感染弥散以及肺泡肺炎有关^[15]。最近, Costerton 等在一个体外中央静脉导管模型中发现金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 生物被膜微菌落能在玻璃管中沿管腔滚动,在滚动的金黄色葡萄球菌微菌落和玻璃管壁之间有粘弹性系绳 (viscoelastic tether) 的变化:在生物被膜结构上游处粘弹性系绳一直被拉长直到被拉断,微菌落向前滚动,在生物被膜结构下游接触点形成另一个粘弹性系绳,如此反复^[4]。

随着研究的深入,上述几种分散策略可能只是生物被膜分散策略中冰山一角,而且从目前研究情况来看某个菌种形成的生物被膜可以有多种不同分散策略。生物被膜分散策略中更为具体机制的进一步阐明可能会有助于对感染转移、反复急性发作机制的研究。

3 结语

通过对生物被膜的研究使人类认识到原核微生物在自然界、人体内可以以多细胞的社会化的生命形式存在,具有比以往所理解的更为复杂的生命活动。生物被膜菌相关的感染越来越受到研究者的重视,研究发现生物被膜的许多生物学特性,如生物被膜的特殊结构具有保护作用以及细菌从成熟生物被膜的脱落、分散的特性与临床难治的感染性疾病有很大关系。生物被膜菌容易在牙齿、支气管及各种生物医学材料表面形成是否和这些部位天然免疫分子,如各种抗菌肽的低表达或缺失有关尚不清楚。相信随着对生物被膜相关机制研究的不断深入,目前临床感染的窘境有望得到好转。

参 考 文 献

- [1] 刘晓琰, 施安国. 中国临床药理学杂志, 2002, **18** (4): 302 ~ 305.
- [2] 李 彤, 庄 辉. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, **22** (3): 343 ~ 346.
- [3] 王 霞, 梁德荣, 苗 佳. 华西医学, 2003, **18** (1): 146 ~ 146.
- [4] Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Nat Rev Microbiol, 2004, **2** (2): 95 ~ 108.
- [5] Kaplan J B, Ragunath C, Ramasubbu N, *et al.* J Bacteriol, 2003, **185** (16): 4693 ~ 4698.
- [6] Tolker-Nielsen T, Brinch U C, Ragas P C, *et al.* J Bacteriol, 2000, **182** (22): 6482 ~ 6489.
- [7] Molin S, Tolker-Nielsen T. Curr Opin Biotechnol, 2003, **14** (3): 255 ~ 261.
- [8] Spoering A L, Lewis K. J Bacteriol, 2001, **183** (23): 6746 ~ 6751.
- [9] Webb J S, Thompson L S, James S, *et al.* J Bacteriol, 2003, **185** (15): 4585 ~ 4592.
- [10] Mai-Prochnow A, Evans F, Dalisay-Saludes D, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2004, **70** (6): 3232 ~ 3238.
- [11] Kaplan J B, Markus F, Meyenhofer, *et al.* J Bacteriol, 2003, **185** (4): 1399 ~ 1404.
- [12] Stoodley P, Wilson S. Appl Environ Microbiol, 2001, **67** (12): 5608 ~ 5613.
- [13] Mattick J S. Annu Rev Microbiol, 2002, **56**: 289 ~ 314.
- [14] Kaplan J B, Fine D H. Appl Environ Microbiol, 2002, **68** (10): 4943 ~ 4950.
- [15] Inglis T J. Br J Anaesth, 1993, **70** (1): 22 ~ 24.