

# 表皮葡萄球菌生物被膜对红霉素渗透性的研究

贾 宁<sup>1\*</sup> 安群星<sup>2</sup> 徐志凯<sup>2</sup> 袁云娥<sup>1</sup> 索继江<sup>1</sup> 邢玉斌<sup>1</sup>

(1. 解放军总医院感染管理与疾病控制科 北京 100853)

(2. 第四军医大学微生物学教研室 西安 710032)

**摘 要:** 为探讨表皮葡萄球菌生物被膜对红霉素的渗透性, 我们采用生物被膜抗生素渗透模型检测 *Staphylococcus epidermidis* 1457、1457-msrA 和临床分离株 S68 生物被膜不同时间点红霉素的渗透率, 并用吖啶橙染色激光共聚焦显微镜观察生物被膜内细菌 RNA/DNA 的相对含量; 扫描电子显微镜观察膜内细菌的密度。红霉素作用 36 h 后, 1457、1457-msrA、S68 的渗透率分别为 0.93、0.55 和 0.4; 1457 渗透地较快, 8 h 后渗透率即达到 0.58, 而 1457msrA 和 S68 相对较为缓慢, 24 h 后分别为 0.499 和 0.31; 吖啶橙染色可见红霉素作用下膜内菌 RNA 和 DNA 的相对比例减小, 生长速率下降; 扫描电子显微镜观察可见生物被膜红霉素作用后空气面的细菌数与琼脂面相比均较少, 细胞碎片相对较多, 而对照组(无抗生素作用)琼脂面和空气面的细菌密度和分布较均匀。可见红霉素可渗透入表皮葡萄球菌生物被膜, 但不能完全杀死膜内细菌; 膜内细菌在生物被膜环境中生长速率下降, 有助于降低细菌对红霉素的敏感性。

**关键词:** 表皮葡萄球菌, 生物被膜, 渗透性

## The Erythromycin Penetration Through *Staphylococcus epidermidis* Biofilm

JIA Ning<sup>1\*</sup> AN Qun-Xing<sup>2</sup> XU Zhi-Kai<sup>2</sup> YUAN Yun-E<sup>1</sup> SUO Ji-Jiang<sup>1</sup> XING Yu-Bin<sup>1</sup>

(1. Department of Nosocomial Infection and Disease Control, PLA General Hospital, Beijing 100853)

(2. Department of Microbiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

**Abstract:** To explore the erythromycin penetration through *Staphylococcus epidermidis* biofilm. The penetration ratio of erythromycin through *Staphylococcus epidermidis* biofilm of 1457, 1457-msrA and S68 isolates were detected by biofilm penetration model at different time points. The RNA/DNA ratio and the cell density within the biofilms were observed by confocal laser microscope and transmission electromicroscope, respectively. The penetration ratios of erythromycin through the biofilms of 1457, 1457-msrA and S68 after 36 h were 0.93, 0.55 and 0.4, respectively. The erythromycin penetration ratio through 1457 biofilm (with 0.58 after 8 h) was faster than two others (with 0.499 and 0.31 after 24 h). The slower growth rate of the cells in biofilm was shown, with reduction of RNA/DNA proportion observed by confocal laser microscope through acridine orange stain. Compared with the control group observed by transmission electromicroscope, the cell density of biofilm air face was lower than that of agar face, with more cell debris. Erythromycin

could penetrate into the *Staphylococcus epidermidis* biofilm, but couldn't kill the cells thoroughly. The lower growth rate of the cells within biofilm could help to decrease the erythromycin susceptibility.

**Keywords:** *Staphylococcus epidermidis*, Biofilm, Penetration ratio

表葡萄菌引发感染难治性除了抗生素的选择压力下耐药性增加以外,还在于其吸附于机体粘膜或插管、人工关节等生物医学材料表面,分泌多糖基质、纤维蛋白、脂多糖等多糖复合物,相互粘连并克隆产生的生物被膜(Biofilm)。生物被膜的产生使膜内菌对抗生素的耐药性比浮游菌增加 10~1000 倍,其引发的感染常常只有移走植入物才能控制<sup>[1]</sup>。近年来大环内酯-林可酰胺-链阳菌素B(MLS<sub>B</sub>)类抗生素发展很快,在临床广泛应用。MLS<sub>B</sub>类抗生素的化学结构虽然不同,对细菌蛋白合成的抑制作用却十分相似,对红霉素耐药的细菌常伴随对其它MLS<sub>B</sub>类抗生素的交叉耐药<sup>[2]</sup>。为了进一步研究表葡萄菌生物被膜对红霉素的耐药机制,我们对表葡萄菌生物被膜对红霉素的渗透性进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

*Staphylococcus epidermidis* 1457、1457-msrA(本实验室构建)和临床分离株 S68 均为产膜菌,红霉素最小抑菌浓度分别为 0.25 μg/mL、16 μg/mL 和 32 μg/mL。

### 1.2 生物被膜抗生素渗透实验

**1.2.1 生物被膜抗生素渗透模型<sup>[3]</sup>:**表葡萄菌过夜摇动增菌并稀释至光密度为 0.2( $\lambda=600$  nm),在琼脂平板上放直径为 25 mm、孔径为 0.20 μm 的微孔滤膜,取 10 μL 新鲜菌液均匀接种于滤膜上,37 °C 培养 48 h 形成生物被膜,在被膜上放置直径为 13 mm 的 0.20 μm 微孔滤膜,之上放置不含抗生素的药敏纸片,纸片在放置之前用 24 μL 增菌液浸湿,以防止抗生素通过被膜的毛细管作用,这 3 部分组成生物被膜渗透模型(Colony biofilm, CB)。

**1.2.2 检测方法:**将CB以无菌方式转移至含红霉素(15 μg/mL)的平板上,37 °C 培养,抗生素将通过下面与琼脂接触的滤膜和细菌生物被膜以及上层滤膜到达纸片,作用一定时间后,取下纸片,用parafilm包好,4 °C 保存。待纸片收集齐后,将纸片放在涂有 100 μL 对抗生素敏感的标准菌株 *S. epidermidis* 12228 新鲜菌液(菌液浓度 10<sup>5</sup> CFU/mL)的M-H平板上,37 °C 培养 20 h,测量抑菌环;每个时间点取样 3 个,测得

抑菌环平均值后,按已建立的抑菌环与抗生素浓度回归模型推测纸片上的抗生素浓度。抗生素浓度与抑菌环关系的标准曲线通过测量已知浓度的抗生素抑菌环绘制。计算抗生素渗透率(纸片中抗生素浓度/琼脂平板中抗生素浓度)。

**1.2.3 对照组:**1) CB 放于不含抗生素平板上,作用后取纸片置于 MH 含菌培养皿上,不产生抑菌环,说明细菌不产生干扰生物测量的抑菌物质;2) 在不含抗生素的平板上,取自无细菌生物被膜的 CB 的纸片不产生抑菌环,说明滤膜本身并不携带抑菌物质;3) 将 CB 从含抗生素的平板上取走后,均匀涂抹敏感菌液后,细菌不生长,包括 CB 所在的位置,说明平板中的抗生素不会降解和被中和。

### 1.3 吖啶橙染色观察生物被膜内RNA-DNA相对含量<sup>[4]</sup>

按上述方法培养形成生物被膜后,转移至含红霉素(15 μg/mL)的琼脂平板上,每隔 12 h 更换平板,24 h 后取样,实验重复 3 次;冰冻包埋细菌膜单位,用冰冻切片机对膜单位进行垂直切片,厚度约 5 μm,在相差显微镜下观察确认包含细菌膜单位;用 4 含 10%甲醛、5%冰醋酸和 85%乙醇的固定液固定 4 min,然后用 85%乙醇冲洗 2 遍,空气干燥,固定的切片-20 °C 冰箱保存;4 mg/L 吖啶橙对切片染色 5 min 后吸去多余的染液;激光共聚焦显微镜扫描并照相。激光共聚焦扫描显微镜型号:Bio-Rad 公司 Radiance 2100™;GFP:Arion 激光器,488 nm 激发,发射滤片 HQ515/30;DAPI:Blue Diode 激光器,405 nm 激发,发射滤片 HQ485/30;TRITC:Green HeNe 激光器,543 nm 激发,发射滤片 HQ590/70;显微镜:Nikon 公司 TE300;图像采集软件:LaserSharp 2000 5.2(Bio-Rad, CA, USA);分析软件:LaserPix 4.0.0.13 (Bio-Rad, CA, USA)。

### 1.4 透射电镜观察

生物被膜标本用 5%戊二醛固定 12 h,用 1%的四氧化锇染色并洗脱,经过乙醇系列脱水,1% 乙酸双氧铀-1%磷钨酸染色,包埋于 Spurr's 双氧树脂,70 °C 聚合 14 h,切片后用醋酸铅染色,用透射电镜(JEM-1200EX, Japan)观察。标本:48 h 培养形成生物被膜(Zero control);48 h 培养形成生物被膜后转至

含抗生素的平板上继续培养 24 h。

## 2 结果

### 2.1 表皮葡萄球菌生物被膜对红霉素的渗透性

根据已知浓度的抗生素抑菌环建立回归模型： $y=0.54x-4.19$ ，其中  $x$  为抑菌环直径， $y$  为推测的红霉素浓度。红霉素对表皮葡萄球菌 1457 的 MIC 为  $0.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，对 1457-msrA 和临床分离株 S68 的 MIC 分别为  $16\text{ }\mu\text{g/mL}$  和  $32\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，其形成的生物被膜在含  $15\text{ }\mu\text{g/mL}$  红霉素的平板上继续培养 36 h 后，1457 的渗透率为 0.93，1457 msrA 的渗透率为 0.55，S68 的渗透率为 0.45，1457 渗透的较快，8h 后渗透率即达到 0.58，而 1457 msrA 和 S68 相对较为缓慢，24 h 后分别为 0.499 和 0.31(见图 1)。

### 2.2 吖啶橙染色观察生物被膜内 RNA-DNA 相对含量

*S. epidermidis* 1457、1457-msrA、S68 在膜单位上培养 48 h 形成生物被膜后，转移至含红霉素( $15\text{ }\mu\text{g/mL}$ )的平板上继续培养，吖啶橙染色并用激光共聚焦显微镜观察，结果显示被膜形成后 0 h 以

红橙色光为主，RNA/DNA 相对较大，生长速率高；随着培养时间的延长，红霉素作用组与对照组均显示黄绿色光逐渐增加，RNA/DNA 减小，生长速率降低；被膜内部细胞的生长速率明显较空气面和琼脂面低，呈现绿色，并随着培养时间的延长范围逐渐加大；抗生素作用 24 h~48 h 后，橙红色光依然存在，显示细菌 RNA 仍在合成(见图 2)。

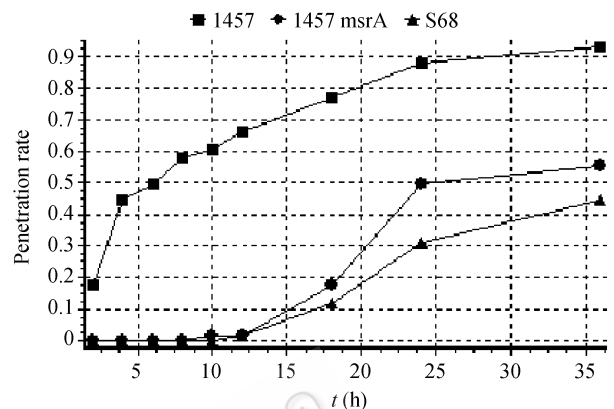


图 1 不同细菌生物被膜对红霉素的渗透率

Fig. 1 Penetration rate of erythromycin through biofilms of *S. epidermidis* isolates

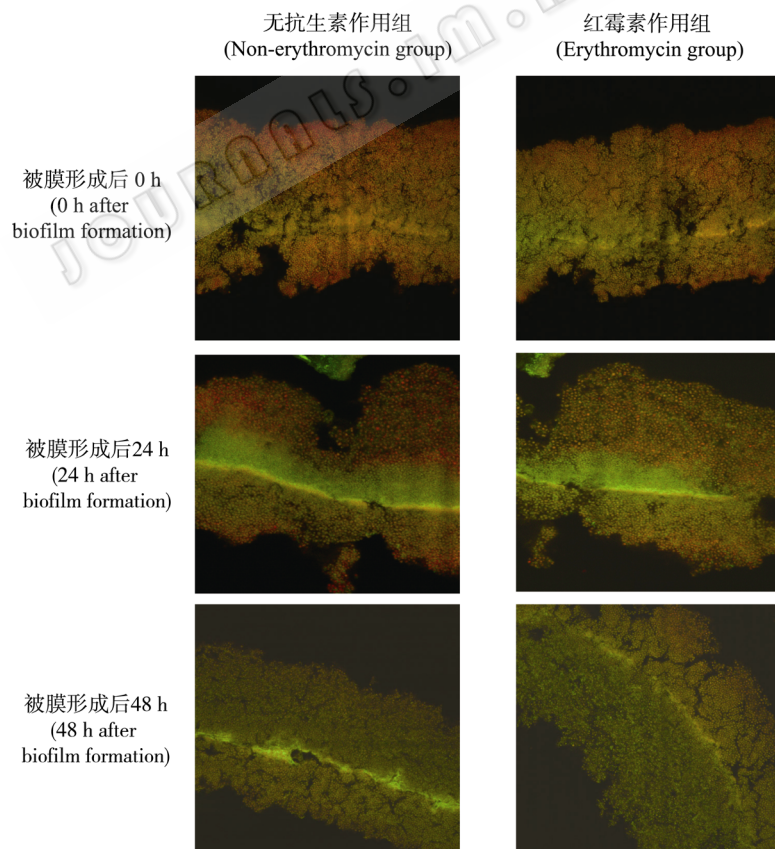


图 2 吖啶橙染色观察 *S. epidermidis* 1457 生物被膜内 RNA-DNA 相对含量( $\times 100$ )

Fig. 2 The RNA-DNA ratio in *S. epidermidis* 1457 biofilms stained by acridine-orange( $\times 100$ )

注：靠图片底部的是被膜琼脂面，靠上部的是空气面

Note: The agar-contact surface of biofilm is near the downside of the picture, the air surface of biofilm is near the upside of the picture

### 2.3 透射电镜观察结果

在 *S. epidermidis* 1457 形成生物被膜后, 红霉素作用前(对照)的被膜内细菌呈圆形(葡萄球菌的形态), 在被膜琼脂面、中间层和空气面变化不明显, 分布较均匀; 红霉素(15  $\mu\text{g/mL}$ )作用 12 h 后, 被膜内细菌含有膨胀、液化的细胞和细胞碎片, 细菌排列较对照组疏松, 空气面细菌数较琼脂面少; 红霉素作用 24 h 后, 被膜内细菌膨胀、液化和破碎更加严重, 排列更为疏松(见图 3)。

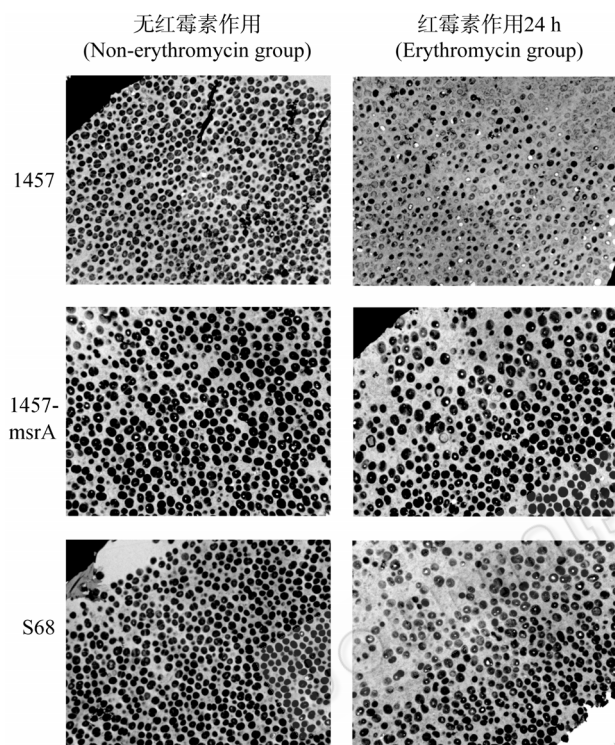


图 3 *S. epidermidis* 1457、1457-msrA、S68 生物被膜透射电镜结果( $\times 5000$ )

Fig. 3 The biofilms of *S. epidermidis* 1457, 1457-msrA and S68 isolates observed by transmission electron microscopy ( $\times 5000$ )

### 3 讨论

对于为什么细菌在生物被膜内其对抗生素的耐药性会增加, 人们会自然地想到富含多糖复合物的生物被膜具有屏障作用, 即抗生素的渗透受到阻碍。Anderl<sup>[3]</sup>等提出的三明治样生物被膜渗透模型, 即夹在两层微孔滤膜间的生物被膜模型, 为检测生物被膜对抗生素的渗透性提供了简单易行的方法, 其特点是可以同时大量制作, 且易于转移和收获。

实验表明红霉素可渗透 *S. epidermidis* 1457、*S. epidermidis* 1457-msrA 和野生株 S68 形成的生物被膜, 24 h 后渗透率分别达到 0.87、0.499 和 0.31; 但表葡萄菌生物被膜对红霉素的渗透比较缓慢, 红霉素作用 4 h 后, 1457 的渗透率为 0.43, 而在 1457 msrA 和 S68 中尚未检测出渗透的红霉素; 生物被膜抗生素作用 24 h 后电镜结果可见膜内菌的数量有明显的减少, 也证明红霉素可渗透入膜内, 作用并杀死膜内一定数量的细菌。最近, Jefferson 等<sup>[5]</sup>通过对万古霉素荧光标记并采用激光共聚焦观察金黄色葡萄球菌生物被膜对万古霉素的渗透, 提出生物被膜使抗生素的渗透的延迟与膜内细菌耐药性增加相关, 浮游状态下的细菌能全部快速暴露于抗生素, 而膜内深层的细菌则暴露于浓度逐渐增加的抗生素, 低浓度的抗生素为膜内菌诱导产生耐药性提供了机会。

与 *S. epidermidis* 1457 形成的生物被膜相比, *S. epidermidis* 1457 msrA 和 S68 生物被膜对红霉素的渗透较为缓慢, 这可能与它们的 MIC 不同有关。红霉素对 *S. epidermidis* 1457 的 MIC 为 0.25  $\mu\text{g/mL}$ , 而对 *S. epidermidis* 1457-msrA 和临床分离株 S68 的 MIC 分别为 16  $\mu\text{g/mL}$  和 32  $\mu\text{g/mL}$ 。电镜结果显示红霉素(15  $\mu\text{g/mL}$ )培养 24 h 后的 S68 生物被膜与 1457 被膜相比, 膨胀、液化的细胞和细胞碎片少, 细菌排列更加均匀、致密, 被膜相对较厚, 不利于红霉素的物理性渗透; 但是无论是对红霉素敏感的 1457 还是对红霉素耐药的 S68, 抗生素作用后其空气面的细菌数与琼脂面相比均较少, 细胞碎片相对较多, 而对照组(无抗生素作用)琼脂面和空气面的细菌密度和分布较均匀, 这也从另一方面证实红霉素可渗透生物被膜。

既然红霉素可渗透过生物被膜, 那么为什么仅对生物被膜远端(与空气接触边缘)的细菌有杀伤作用, 而在膜内, 甚至直接接触红霉素的琼脂面的细菌数却没有相应减少呢? 可见包埋于被膜中的细菌除了生物被膜的屏障作用以外, 一定存在着其他机制保护膜内细菌的生存。由于细菌在浮游状态下, 生长缓慢常常伴随对抗生素耐药性的增加<sup>[6,7]</sup>, 我们通过吖啶橙染色并用激光共聚焦对表葡萄菌生物被膜内细菌的生长速率进行了观察。由于橙色染料与单链核苷酸结合, 绿色染料与双链核苷酸结合, 而 RNA 主要以单链存在, DNA 主要以双链存在, 因而

不同的染色显示了细胞内RNA和DNA的相对比例;在生长率高的细胞中, RNA/DNA值相对较大, 显示橙色, 而在生长缓慢的细胞中, RNA/DNA值较小, 显示黄色或绿色<sup>[4]</sup>。实验结果显示, 被膜形成后 0 h 以红橙色光为主, RNA/DNA值相对较大, 生长率高;随着培养时间的延长, 红霉素作用组与对照组均显示黄绿色光逐渐增加, RNA/DNA值减小, 生长率降低;抗生素作用 24 h~48 h后, 被膜内部和琼脂面细菌的生长速率明显较空气面低, 呈现绿色为主, 并随着培养时间的延长范围逐渐加大。可见尽管有一定浓度的红霉素渗入膜内, 但膜内细菌在生物被膜环境中生长速率下降, 有助于降低细菌对红霉素的敏感性。

## 参 考 文 献

- [1] Rodney MD, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002, **15**(2): 167-193.
- [2] Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, et al. Dimitracopoulos erm(C) is the predominant genetic determinant

for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *J Antimicrob Chemother*, 2004, **53**(5): 814-817.

- [3] Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44**(7): 1818-1824.
- [4] Wentland EJ, Stewart PS, Huang CT, et al. Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. *Biotechnol Prog*, 1996, **12**(3): 316-321.
- [5] Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agent Chemother*, 2005, **49**(6): 2467-2473.
- [6] Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiol*, 2000, **146**(3): 547-549.
- [7] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agent Chemother*, 2001, **45**(4): 999-1007.
- [8] Walters III MC, Roe F, Bugnicourt A, et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agent Chemother*, 2003, **47**(1): 317-323.

稿件书写规范

## 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前三个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。