

## 研究报告

## 抗菌肽 17BIPHE2 对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用

回丽媛<sup>1</sup> 李军<sup>1</sup> 朱明星<sup>2</sup> 王秀青<sup>1\*</sup>

(1. 宁夏医科大学临床医学院 检验系 宁夏 银川 750004)

(2. 宁夏医科大学科技中心 宁夏 银川 750004)

**摘要:**【目的】研究抗菌肽 17BIPHE2 单独使用及联合抗生素对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)生物被膜的抑制作用。【方法】采用刚果红平板测试法和结晶紫染色评估受试菌形成生物被膜的能力;微量肉汤稀释法和琼脂平板测试法测定金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC);利用抑制金黄色葡萄球菌黏附实验和生物被膜形成抑制实验观察 17BIPHE2 单独使用及联合抗生素对生物被膜黏附阶段和形成阶段的影响;通过扫描电子显微镜(SEM)观察 17BIPHE2 单独使用及联合抗生素对成熟生物被膜的清除作用。【结果】17BIPHE2 的 MIC 为 8  $\mu\text{mol/L}$ ,  $1/2 \times \text{MIC}$  就可以有效抑制浮游菌的生长。单独使用 17BIPHE2 在细菌黏附阶段抑制率为 40%,在生物被膜形成阶段抑制率达到 35%。17BIPHE2 联合抗生素使用较单独使用抗生素其抑制率均有所下降。生物被膜成熟阶段 17BIPHE2 于  $1/4 \times \text{MIC}$  浓度即可促进生物被膜崩解,  $1 \times \text{MIC}$  生物被膜崩解同时细菌黏附量有所下降,联合万古霉素促进生物被膜崩解同时细菌胞质大量外泄。【结论】抗菌肽 17BIPHE2 具有良好的抑制金黄色葡萄球菌生物被膜作用,联合抗生素其抗生物被膜作用进一步提高。这将为治疗由金黄色葡萄球菌生物被膜引起的相关感染提供了一个新思路。

**关键词:** 抗菌肽, 17BIPHE2, 金黄色葡萄球菌, 生物被膜

Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by antimicrobial peptide 17BIPHE2HUI Li-Yuan<sup>1</sup> LI Jun<sup>1</sup> ZHU Ming-Xing<sup>2</sup> WANG Xiu-Qing<sup>1\*</sup>

(1. Department Clinical Laboratory Medicine, Clinical Medicine College of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

(2. Science and Technology Center of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

**Abstract:** [Objective] To study the inhibition of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) biofilm by antimicrobial peptide 17BIPHE2 used alone or combined with antibiotics. [Methods] Congo red plate test and crystal violet staining test were used to assess the ability of biofilm formation by *S.*

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31360622); The Open Project of Key Laboratory of Ningxia Clinical Pathogenic Microorganism (No. LCPM201501)

\*Corresponding author: E-mail: xiuqingwang1979@163.com

Received: May 17, 2016; Accepted: July 20, 2016; Published online (www.cnki.net): August 31, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360622) ;宁夏临床病原微生物重点实验室开放课题项目(No. LCPM201501)

\*通讯作者: E-mail: xiuqingwang1979@163.com

收稿日期: 2016-05-17; 接受日期: 2016-07-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-08-31

*aureus*. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *S. aureus* were tested by broth microdilution method and agar plate method. The bacteria adhesion was observed by *S. aureus* adhesion test and biofilm formation was analyzed by biofilm formation test. They were treated by 17BIPHE2 alone or combined with antibiotics. The removal of mature biofilm was observed by scanning electron microscope (SEM) after the treatment of 17BIPHE2 alone or combined with antibiotics. **[Results]** When MIC of 17BIPHE2 was 8  $\mu\text{mol/L}$ ,  $1/2 \times \text{MIC}$  could inhibit the growth of planktonic bacteria effectively. In the adhesion stage, the inhibition rate was 40% by 17BIPHE2 treated only. In the biofilm formation stage, the inhibition rate was 35%. Further, the rates for both stages decreased if combined with antibiotics. Antimicrobial peptide 17BIPHE2 could promote biofilm disintegration in the mature stage at  $1/4 \times \text{MIC}$  concentration. Biofilm disintegration and bacterial adhesion could decrease at  $1 \times \text{MIC}$  concentration. Furthermore, the combination of vancomycin promoted disintegration of bacterial biofilm as well as lots of leakage. **[Conclusion]** Antimicrobial peptides 17BIPHE2 was able to inhibit biofilm effectively, especially combined with antibiotics, could promote the inhibition more effectively. This article provides a new idea for treatment of *S. aureus* biofilm related infection.

**Keywords:** Antimicrobial peptide, 17BIPHE2, *Staphylococcus aureus*, Biofilm

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种革兰氏阳性菌,广泛分布于自然界、人类体表及与外界相通的腔道中,约 1/3 的健康人群稳定携带该细菌<sup>[1]</sup>。同时,金黄色葡萄球菌是一种常见的人畜共患病病原菌,具有较高的发病率和死亡率,可引起局部皮肤、组织、器官的化脓性感染及食物中毒,甚至菌血症和中毒性休克<sup>[2-3]</sup>。2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测数据显示,革兰氏阳性细菌中金黄色葡萄球菌的分离率居于首位<sup>[4]</sup>。

生物被膜(Biofilm, BF)是细菌为了适应环境的变化,在生长过程中自身产生的由多聚物质包绕形成,附着于生物体或分生物体的表面,形成的有多层细胞细菌组成的结构群体<sup>[5]</sup>。生物被膜中细菌形成了复杂的结构,可以抵御宿主免疫反应并导致细菌对抗生素及消毒敏感性降低,从而增强其在宿主和环境中的生存能力。传统抗生素可能由于生物被膜的屏障作用和生物被膜微环境改变造成其对成熟生物被膜没有作用,这就导致生物被膜难治性和感染的持续性<sup>[6-7]</sup>。因此寻求新的抗生物被膜药物,成为目前解决生物被膜相关感染的有效途径之一。

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是广泛存在于生物体内由特定基因编码产生,具有抵御外

界微生物侵害及清除体内突变细胞作用的一类小分子多肽,是生物天然免疫防御系统的重要组成部分<sup>[8-9]</sup>。LL-37 是抗菌肽 Cathelicidin 家族中唯一存在于人体的抗菌肽。近年来研究证实,LL-37 是先天性宿主免疫效应中的一个重要分子,主要由中性粒细胞和各种上皮细胞等产生,能参与抗细菌、真菌、病毒、肿瘤细胞及寄生虫,是天然免疫的重要组成部分,同时也参与适应性免疫调节<sup>[10-13]</sup>。本课题组前期选用了抗菌肽 LL-37 衍生肽 17BIPHE2,由美国内布拉斯加医学中心王广顺教授设计合成,氨基酸序列为 GBKRLVQRLKDBLRNLV(L 为 D 型亮氨酸, B 为联苯丙氨酸)<sup>[14]</sup>。实验证实 17BIPHE2 对金黄色葡萄球菌浮游菌和生物被膜均具有良好的抑菌效果,对比 LL-37 其溶血活性明显降低,但本实验室研究结果与王广顺实验室前期报道结果并不完全一致(本实验室与美国内布拉斯加医学中心王广顺教授长期具有合作关系)<sup>[15]</sup>,而该抗菌肽亚抑菌浓度及联合抗生素抑制浮游菌和生物被膜作用并未做深入研究。本文旨在研究 17BIPHE2 单独使用及抗生素联合应用对浮游菌和生物被膜形成各个阶段的作用,为未来临床感染的控制和新型抗菌药物的研发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 LL-37 衍生肽 17BIPHE2:** 氨基酸序列为: GBKRLVQRLKDBLRNLV (L 为 D 型亮氨酸, B 为联苯丙氨酸), 由吉尔生化(上海)有限公司采用固相化学合成法合成, 纯度(HPLC)纯度 $\geq 95\%$ 。ddH<sub>2</sub>O 作为抗菌肽的溶剂。

**1.1.2 菌种:** 金黄色葡萄球菌实验菌株为临床分离菌株, 由宁夏医科大学总医院实验中心提供。金黄色葡萄球菌标准菌株(ATTC25923)由宁夏医科大学病原微生物重点实验室提供。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 万古霉素、米诺环素、红霉素、庆大霉素和克拉霉素, 大连美仑生物技术有限公司; MH 培养基和 TSB 培养基, 英国 OXOID 公司; 脑心浸液培养基, 北京 Solarbio 科技有限公司。96 和 24 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司; Multiskan GO 全波长酶标仪, 美国 Thermo Fisher 公司; 恒温摇床, 江苏太仓市华利达实验设备有限公司; Hitachi S-3400N 扫描电子显微镜, 株式会社日立制作所。

### 1.2 刚果红平板测试法定性受试菌形成生物被膜能力

参照相关文献[16]并稍作修改, 具体过程为: 挑取单个菌落接种于 TSB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 将培养好的细菌划线于刚果红琼脂平板上, 于恒温培养箱内 37 °C 培养 18 h, 然后置于室温 72 h 观察菌落变化特点。判断标准: 若菌落变为黑心且干燥则为阳性, 红色且湿润则为阴性。

### 1.3 结晶紫染色定量受试菌形成生物被膜能力

取单个菌落接种于 TSB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 取 1% 菌液继续放大培养 2 h, OD<sub>600</sub> 调整菌液浓度至 0.5 麦氏浊度, TSB 培养基继续稀释 100 倍至  $1 \times 10^6$  CFU/mL。取稀释好的菌液 200  $\mu$ L 接种到 96 孔培养板上, 每个菌株重复 6 个复孔, 以培养基为空白对照, 置 37 °C 培养 24 h。培养结束后, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗

3 次, 以洗去杂质和浮游菌, 然后在各孔中加甲醇 200  $\mu$ L 固定生物被膜, 15 min 后弃去甲醇, 晾干后加入 0.1% 结晶紫 200  $\mu$ L 染色 5 min, 洗去多余染液, 晾干, 每孔加入 200  $\mu$ L 33% 冰醋酸, 酶标仪高速振荡 20 min 后测定波长 595 nm 处的光密度值, 未接种菌株的空白孔染色后作为空白对照。OD 值反映生物被膜与接触表面黏附的牢固程度, 依据临界 OD<sub>c</sub> 值(OD<sub>c</sub> 等于空白孔的平均值加上其 3 倍的标准差而得到的 OD 值)可对生物被膜分类: OD $\leq$ OD<sub>c</sub> 为不黏附(0), OD<sub>c</sub><OD $\leq$ 2OD<sub>c</sub> 为弱黏附(+), 2OD<sub>c</sub><OD $\leq$ 4OD<sub>c</sub> 为中等黏附(++), OD>4OD<sub>c</sub> 为强黏附(+++)。

### 1.4 生物被膜模型建立和观察

采用含有 1% 葡萄糖的 TSB 培养基配制终浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的工作菌液, 在 96 孔板中每孔加入工作菌液 200  $\mu$ L, 24 孔板中加入预先泡酸处理的盖玻片, 加入工作菌液 1 mL。将加有菌液的培养板置于 37 °C 温箱中培养 24 h。培养结束后在 96 和 24 孔板中的盖玻片即形成了生物被膜。采用结晶紫进行染色, 使用普通光学显微镜 100 倍下进行观察。

### 1.5 药物敏感性实验

参照 CLSI (Clinical laboratory standards institute) 指南<sup>[17]</sup>, 采用微量肉汤稀释法和琼脂平板测试法测定 17BIPHE2 和抗生素单独使用及联合应用对受试菌(*S. aureus* 05、*S. aureus* ATTC25923)的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(Minimal bactericidal concentration, MBC)。挑取单个菌落于 37 °C 过夜培养, 次日接种至新鲜培养基中进行放大培养 2 h, OD<sub>600</sub> 调整菌液浓度至 0.5 麦氏浊度, MH 稀释 1 000 倍至  $1 \times 10^5$  CFU/mL。向 96 孔培养板各加入 100  $\mu$ L 经倍比稀释的 17BIPHE2、抗生素溶液和两种药物的混合溶液, 使最终药物浓度分别为 128.000、64.000、32.000、16.000、8.000、4.000、2.000、1.000、0.500、0.250、0.125  $\mu$ mol/L, 再加入 100  $\mu$ L 上述菌液, 终体积为 200  $\mu$ L。以 MH 培养基作为阴性对

照, 以未加药的菌液作为阳性对照, 于 37 °C 培养 16–20 h, 酶标仪于 600 nm 测定其吸光度值。以  $OD$  值不再有显著变化的最小浓度定义为最小抑菌浓度 MIC。将 MIC 测定中未见细菌生长的菌液接种于 TSA 固体培养基, 37 °C 培养 18 h, 以仍无细菌生长的药物浓度定义为最小杀菌浓度 MBC。将上述菌液接种于 96 孔板, 加入不同浓度的 17BIPHE2, 于 37 °C 培养, 每 4 h 取样测定  $OD_{600}$  吸光度值, 绘制生长曲线。

### 1.6 抑制金黄色葡萄球菌黏附实验

培养基中加入  $1 \times 10^8$  CFU/mL 含有 1% 葡萄糖的 TSB 菌悬液 100  $\mu$ L, 然后加入 100  $\mu$ L 不同浓度的 17BIPHE2 药物溶液、抗生素溶液和两种药物的混合溶液, 37 °C 分别孵育 1、2 或 4 h。每个浓度 17BIPHE2 都有 6 个复孔, 阳性孔只加入菌悬液, 阴性孔只加入含有 1% 葡萄糖的 TSB 培养基。培养结束后, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗 3 次以洗去杂质和浮游菌, 然后在各孔中加甲醇 200  $\mu$ L 固定生物被膜, 15 min 后弃去甲醇, 晾干后加入 0.1% 结晶紫 200  $\mu$ L 染色 5 min, 洗去多余染液, 晾干, 每孔加入 200  $\mu$ L 33% 冰醋酸, 酶标仪高速振荡 20 min 后测定波长 595 nm 处的吸光度值。实验重复 3 次。

### 1.7 生物被膜形成抑制实验

于 96 孔板中加入  $1 \times 10^6$  CFU/mL 含有 1% 葡萄糖的 TSB 菌悬液 100  $\mu$ L, 然后加入不同浓度的 17BIPHE2 药物溶液、抗生素溶液和两种药物的混合溶液 100  $\mu$ L, 37 °C 孵育 24 h。每个浓度药物处理组都有 6 个复孔, 阳性孔只加入菌悬液, 阴性孔只加入含有 1% 葡萄糖的 TSB 培养基。培养结束后, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗 3 次, 以洗去杂质和浮游菌, 然后在各孔中加甲醇 200  $\mu$ L 固定生物被膜, 15 min 后弃去甲醇, 晾干后加入 0.1% 结晶紫 200  $\mu$ L 染色 5 min, 洗去多余染液, 晾干, 每孔加入 200  $\mu$ L 33% 冰醋酸, 酶标仪高速振荡 20 min 后测定波长 595 nm 处的吸光度值。实验重复 3 次。

### 1.8 扫描电子显微镜观察成熟生物被膜结构

按照 1.4 的方法在 24 孔板盖玻片建立生物被

膜, 实验组分别加入 TSB 培养基(含有 1% 葡萄糖)稀释的不同浓度的 17BIPHE2 药物溶液、抗生素溶液和两种药物的混合溶液 1 mL, 对照组只加入培养基。37 °C 孵育 24 h 后用无菌 PBS 溶液轻轻漂洗数次, 2.5% 戊二醛溶液固定, 置 4 °C 保存。标本收集完成后送宁夏医科大学科技中心平台电镜室。经过乙醇梯度脱水后, 将样品放入临界点干燥器内, 干燥后的标本放入高真空蒸发器中, 离子溅射仪喷金后运用扫描电子显微镜观察盖玻片上金黄色葡萄球菌生物被膜的超微结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 受试菌形成生物被膜能力定性及定量观察

临床分离 *S. aureus* 05 可在刚果红平板上形成黑心状、干燥菌落, 表明菌株具有形成生物被膜能力, 临床分离 *S. aureus* 07 在刚果红平板上形成红色、湿润菌落, 表明菌株不会形成生物被膜(图 1)。

结晶紫染色结果(图 2)分析, *S. aureus* 07 测得  $OD \leq OD_c$  为不黏附(0), *S. aureus* 05 测得  $OD > 4OD_c$  为强黏附(+++)。100 倍光学显微镜下结果分析得 *S. aureus* 05 菌体界限不清, 且相互粘连, 形成团块、部分发生重叠、局部有散在菌体相连, 大片团块形成了具有独立单位的典型生物被膜结构, *S. aureus* 07 细菌散在分布, 只有较少细菌粘连, 大部分散在分布。3 种实验结果一致, 表明 *S. aureus* 05 可以形成强黏附的生物被膜, 可以作为后续实验菌株。

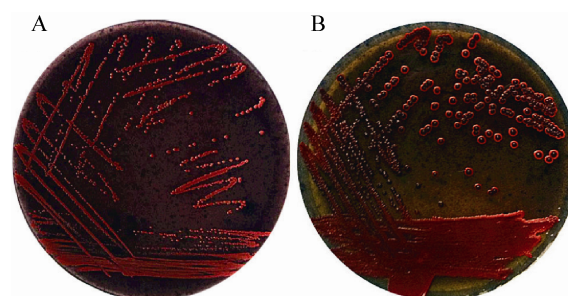


图 1 刚果红平板测试法定性受试菌形成生物被膜能力  
Figure 1 Congo red plate identify the ability of biofilm formation

Note: A: *S. aureus* 07; B: *S. aureus* 05.

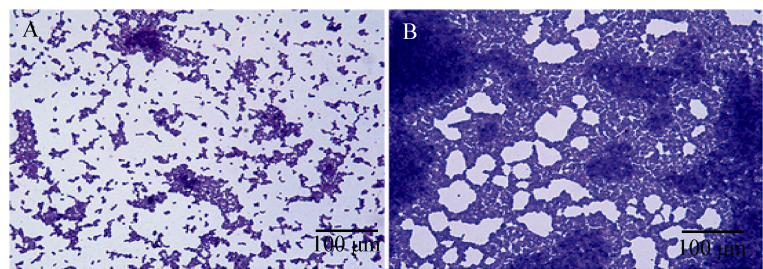


图 2 结晶紫染色观察受试菌生物被膜形成能力

Figure 2 Crystal violet staining identify the ability of biofilm formation

Note: A: *S. aureus* 07; B: *S. aureus* 05.

表 1 17BIPHE2 及常用抗生素抗 <i>S. aureus</i> (浮游菌)抗菌活性				
Table 1 The antimicrobial activity of 17BIPHE2 and antibiotics used alone against planktonic <i>S. aureus</i>				
抗菌药物 Antibacterial drugs	MIC (μmol/L)		MBC (μmol/L)	
	<i>S. aureus</i> 05	ATTC25923	<i>S. aureus</i> 05	ATTC25923
抗菌肽 Antimicrobial peptide 17BIPHE2	8.000	8.000	8.000	16.000
抗生素 Antibiotic				
红霉素 Erythromycin (ERY)	>5 120	0.125	>5 120	0.250
克拉霉素 Clarithromycin (CLR)	>5 120	0.125	>5 120	0.125
庆大霉素 Gentamicin (GEN)	>5 120	1.000	>5 120	2.000
万古霉素 Vancomycin (VAN)	0.500	1.000	1.000	1.000
米诺环素 Minocycline (MNO)	0.250	0.250	0.500	0.500

2.2 17BIPHE2、抗生素药物敏感性实验

17BIPHE2 和抗生素单独使用对金黄色葡萄球菌的抗菌活性如表 1 所示，该测试菌株对红霉素、克拉霉素、庆大霉素耐药，推测可能与生物被膜形成有关，对比 17BIPHE2 在 8 μmol/L 几乎可以完全抑制细菌生长，表明 17BIPHE2 具有良好的抑菌活性。根据标准菌株结果分析 5 种抗生素 MIC 均处于 CLSI 推荐敏感范围，抗生素和 17BIPHE2 的 MIC 和 MBC 结果并没有太大差异。通过图 3 绘制的生长曲线可以发现 17BIPHE2 在亚抑菌浓度就可以明显抑制 *S. aureus* 05 的生长，达到 1×MIC 时几乎完全抑制 *S. aureus* 05 的生长。

17BIPHE2 和抗生素联合应用抗 *S. aureus* 抗菌活性如表 2 所示，17BIPHE2 和两种抗生素联合应用后 MIC 和 MBC 均有所下降，米诺环素较万古霉素下降更为明显。

2.3 抑制金黄色葡萄球菌黏附实验

抑制金黄色葡萄球菌黏附实验观察 17BIPHE2、

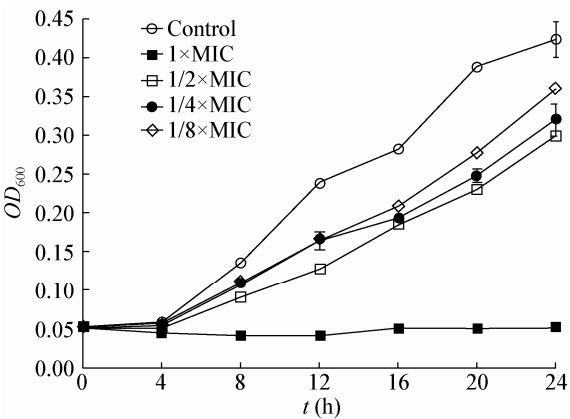


图 3 17BIPHE2 抑制 *S. aureus* 05 的生长曲线

Figure 3 The growth curve of 17BIPHE2 inhibits *S. aureus* 05

抗生素单独使用和联合应用对生物被膜早期黏附的影响，如图 4、5 所示。在细菌形成生物被膜的早期，细菌会黏附到固定支持物上。在此阶段 17BIPHE2 抑制 4 h 黏附率达到 40%左右，米诺环素抑制率达到 70%，而万古霉素对生物被膜早期

表 2 17BIPHE2、抗生素联合应用抗 *S. aureus* (浮游菌) 抗菌活性  
Table 2 The antimicrobial activity of 17BIPHE2 combine with antibiotics against planktonic *S. aureus*

抗菌药物 Antibacterial drugs	MIC (μmol/L)		MBC (μmol/L)	
	<i>S. aureus</i> 05	ATTC25923	<i>S. aureus</i> 05	ATTC25923
17BIPHE2+万古霉素 17BIPHE2+Vancomycin	4.00±0.25	4.00±0.25	8.00±0.25	4.00±0.25
17BIPHE2+米诺环素 17BIPHE2+Minocycline	2.00±0.06	2.00±0.06	2.00±0.06	4.00±0.12

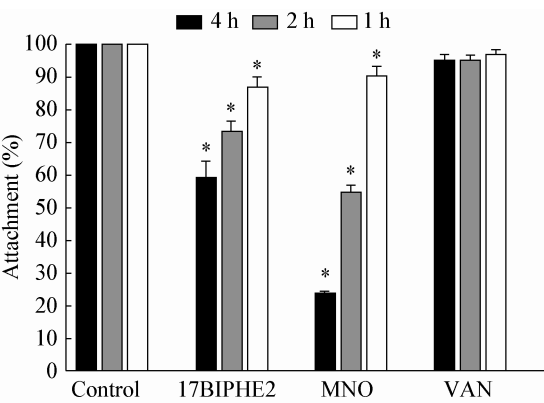


图 4 17BIPHE2、抗生素单独使用抑制金黄色葡萄球菌黏附作用  
Figure 4 Inhibition of *S. aureus* attachment by 17BIPHE2, antibiotics used alone

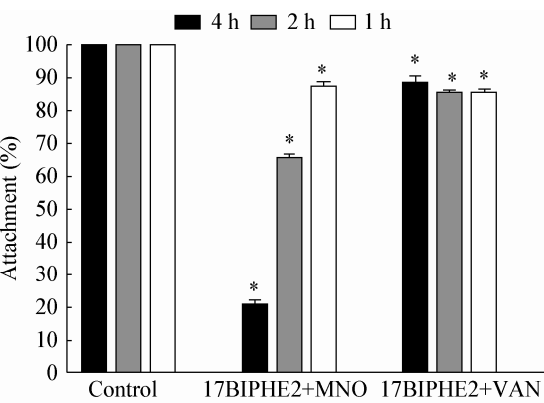


图 5 17BIPHE2、抗生素联合应用抑制金黄色葡萄球菌黏附作用  
Figure 5 Inhibition of *S. aureus* attachment by 17BIPHE2 combine with antibiotics

黏附并没有明显作用。使用 17BIPHE2 联合两种抗生素结果显示较单独使用抗生素其抑制黏附率均有所下降，但经单因素方差分析两两比较结果显示，17BIPHE2 联合米诺环素较单独使用米诺环素其结果没有统计学意义，结果提示可能 17BIPHE2 联合米诺环素并没有协同作用。

2.4 生物被膜形成抑制实验

生物被膜形成抑制实验观察 17BIPHE2、抗生素单独使用和联合应用对生物被膜早期黏附的影响，如图 6、7 所示。在细菌形成生物被膜阶段，17BIPHE2 在 1×MIC 抑制生物被膜产生率达到 35% 左右，在 1/4×MIC 也可以有效抑制生物被膜产生。1×MIC 米诺环素抑制率达到 65%，而万古霉素在 1×MIC 抑制率也达到 20%，但其亚抑菌浓度对生物被膜产生并没有明显作用。使用 17BIPHE2 联合两种抗生素结果显示较单独使用抗生素其抑制生物被膜产生能力均有所提高。结果表明在生物被膜形成阶段 17BIPHE2 单独使用或与抗生素联合作用在生物被膜形成阶段均具有较强的抑制作用。

2.5 扫描电子显微镜观察成熟生物被膜结构

扫描电子显微镜观察生物被膜形成后 17BIPHE2、抗生素单独使用和联合应用对生物被膜清除作用，如图 8、9 所示。实验结果显示，未加药组生物被膜成膜良好，1/4×MIC 17BIPHE2 处理组虽有细菌大量聚集但未见生物被膜形成，1×MIC 17BIPHE2 处理组细菌聚集量较亚抑菌浓度



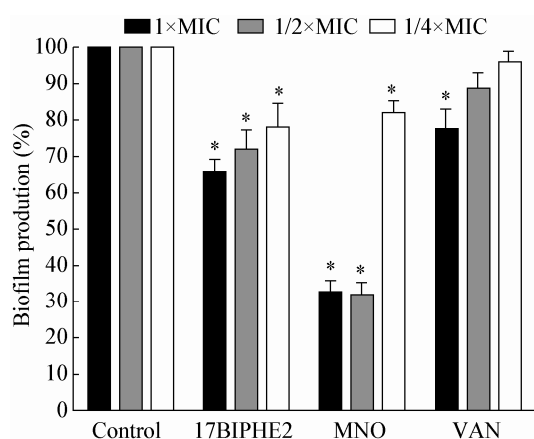


图 6 17BIPHE2、抗生素单独使用对生物被膜形成的影响

Figure 6 Inhibition of the biofilm formation by 17BIPHE2, antibiotics used alone

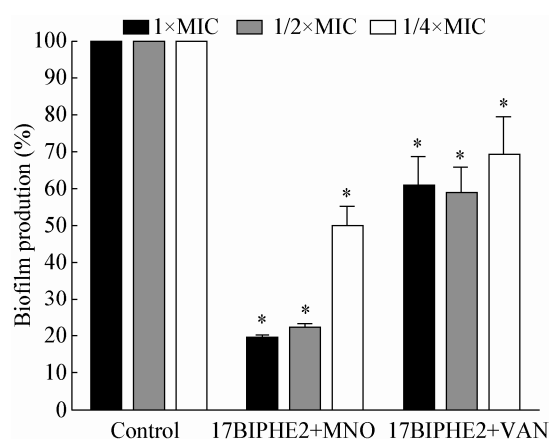


图 7 17BIPHE2、抗生素联合应用对生物被膜形成的影响

Figure 7 Inhibition of the biofilm formation by 17BIPHE2 combine with antibiotics

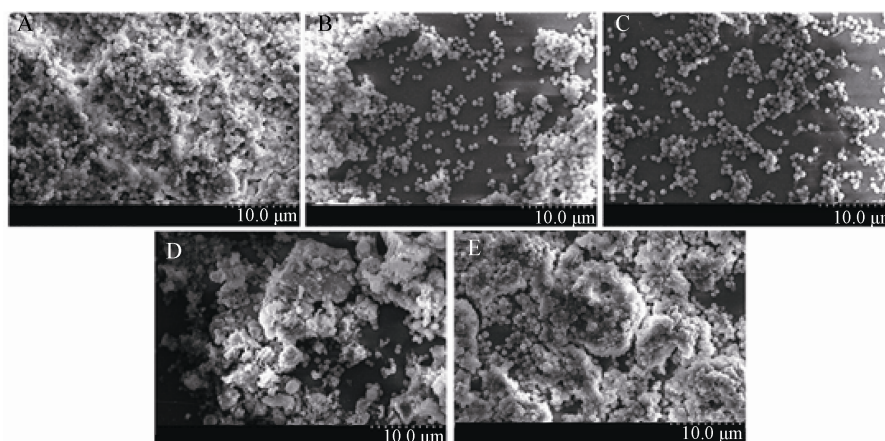


图 8 17BIPHE2、抗生素单独使用对成熟生物被膜清除作用

Figure 8 The effect of 17BIPHE2 or antibiotics used alone to remove mature biofilm

注：A：未加药对照组；B：1/4xMIC 17BIPHE2 处理组；C：1xMIC 17BIPHE2 处理组；D：1xMIC 米诺环素处理组；E：1xMIC 万古霉素处理组。

Note: A: Control; B: 1/4xMIC 17BIPHE2 treatment; C: 1xMIC 17BIPHE2 treatment; D: 1xMIC MNO treatment; E: 1xMIC VAN treatment.

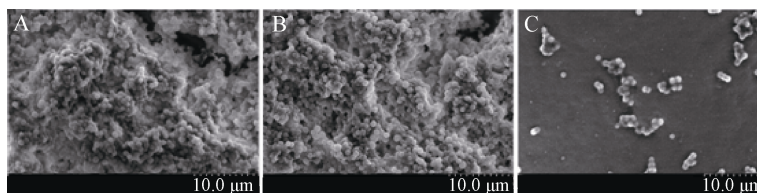


图 9 17BIPHE2、抗生素联合应用对成熟生物被膜清除作用

Figure 9 The effect of 17BIPHE2 combine with antibiotics to remove mature biofilm

注：A：未加药对照组；B：1xMIC 17BIPHE2联合米诺环素处理组；C：1xMIC 17BIPHE2联合万古霉素处理组。

Note: A: Control; B: 1xMIC 17BIPHE2+MNO treatment; C: 1xMIC 17BIPHE2+VAN treatment.

明显减少, 细菌散在存在, 说明 17BIPHE2 在亚抑菌浓度就能促进生物被膜崩解, 在  $1\times\text{MIC}$  不仅使生物被膜崩解, 更能促进细菌黏附量大量减少。单独使用抗生素组, 生物被膜依然大量存在, 说明抗生素在生物被膜形成后难以进入细胞内, 从而不能发挥其抑菌作用。

联合使用 17BIPHE2 和抗生素发现, 17BIPHE2 联合米诺环素难以清除成熟生物被膜, 生物被膜依然大量存在, 可能在生物被膜成熟后阶段 17BIPHE2 不能与米诺环素发挥协同作用。17BIPHE2 联合万古霉素组生物被膜完全被破坏, 细菌大量崩解死亡, 细胞质外泄, 说明 17BIPHE2 联合万古霉素对成熟生物被膜具有良好的清除作用。

### 3 讨论

金黄色葡萄球菌是一种普遍存在的革兰氏阳性细菌, 为常见的机会致病菌, 可以定殖于人的皮肤和鼻粘膜部。与其他革兰氏阳性细菌类似, 其致病性在很大程度上取决于生物被膜的产生<sup>[18]</sup>。微生物形成生物被膜的能力具有普遍性, 邢明勋等<sup>[19]</sup>报道 80% 的微生物属于生物被膜种群, 常见的病原菌几乎都可以形成生物被膜。生物被膜是造成慢性感染及病情迁延不愈的主要原因, 而生物被膜的产生可能与其耐药性密切相关<sup>[20]</sup>, 目前主要有抗生素渗透屏障、微环境改变、群体感性和应激反应等几种学说<sup>[21]</sup>。生物被膜内细菌较浮游型细菌其耐药性提高了 10–1 000 倍, 常用抗生素往往难以对抗成熟阶段生物被膜<sup>[22]</sup>。相关文献证实大环内酯类抗生素具有抗生物被膜特性<sup>[23]</sup>, 但本研究证实临床分离菌株对红霉素、克拉霉素耐药, 难以发挥其抑菌作用。因此探究新型对抗生物被膜药物成为解决生物被膜相关感染的有效途径之一。

抗菌肽 LL-37 作为 Cathelicidin 家族的唯一成员, 不仅具有抗细菌、真菌、病毒作用, 而且还具有结合与中和内毒素、趋化、促进血管生长及抗肿瘤作用<sup>[24-26]</sup>。但其抗菌活性一般, 因此本研究团队选用美国内布拉斯加医学中心设计的 LL-37 衍生肽 17BIPHE2, 实验证实其具有良好的抗金

色葡萄球菌浮游菌和生物被膜特性<sup>[15]</sup>。本文通过微量肉汤稀释法和琼脂平板测定法检测 17BIPHE2 对该株强产膜菌 *S. aureus* 浮游菌的抗菌活性, 发现在  $8\text{ }\mu\text{mol/L}$  就可有效抑制浮游菌生长, 但与王广顺实验室结果( $3.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ )<sup>[14]</sup>并不完全一致, 分析其原因可能与受试菌株不同和 17BIPHE2 合成效能差异有关。对比以往文献报道<sup>[27]</sup>, 17BIPHE2 抗菌活性较 LL-37 ( $>16\text{ }\mu\text{mol/L}$ )有所提高, 与前期实验结果一致<sup>[15]</sup>。进一步通过绘制细菌生长曲线发现, 在亚抑菌浓度该抗菌肽即具有良好的抑菌能力。

据 Dean 等<sup>[28-29]</sup>报道, 抗菌肽 LL-37 具有良好的抗铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌生物被膜活性, 有效抑制其黏附聚集并促进成熟生物被膜分散。D 型 LL-37 通过促进铜绿假单胞菌迁移导致生物被膜形成减少, 同时可以促进生物被膜相关基因表达量下调。但 LL-37 联合抗生素抗 *S. aureus* 生物被膜报道相对较少, 因此本研究主要探讨 17BIPHE2 联合抗生素对 *S. aureus* 生物被膜抑制作用。通过刚果红平板测试法和结晶紫染色鉴定成膜能力较强的菌株, 筛选出 *S. aureus* 05 并于 96 和 24 孔板盖玻片上建立生物被膜模型。采用结晶紫染色定量生物被膜黏附、形成阶段, 发现该抗菌肽在生物被膜形成各个阶段均有良好的抗生物被膜能力, 联合抗生素使用其抑菌能力较单独使用抗生素进一步加强。扫描电子显微镜观察 17BIPHE2 对成熟生物被膜的清除作用发现亚抑菌浓度就可以有效促进生物被膜的崩解。当抑菌浓度上升至  $1\times\text{MIC}$  时细菌黏附量也明显下降, 联合米诺环素并未发现具有协同作用, 联合万古霉素使用后细菌大量崩解死亡。

综上所述, 17BIPHE2 对浮游菌和生物被膜形成阶段具有良好的抗菌活性。17BIPHE2 联合万古霉素对成熟生物被膜抗菌活性进一步提高。这为临床生物被膜相关感染指导用药提供了一个新思路, 也为 17BIPHE2 应用于临床提供了科学依据。关于 17BIPHE2 抑制生物被膜作用的相关机制尚未阐明, 有待进一步研究。



## 参考文献

- [1] van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, et al. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2009, 9(1): 32-47
- [2] Wertheim HF, Vos MC, Ott A, et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers[J]. The Lancet, 2004, 364(9435): 703-705
- [3] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1997, 10(3): 505-520
- [4] Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. CHINET 2014 surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2015, 15(5): 401-410 (in Chinese)  
胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2014 年中国 CHINET 细菌耐药性检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(5): 401-410
- [5] Talebi M, Moghadam NA, Mamoozi Z, et al. Antibiotic resistance and biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in patient and environmental samples[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2015, 8(10): e23349
- [6] Li SM, Zhu C, Fang SY, et al. Ultrasound microbubbles enhance human  $\beta$ -defensin 3 against biofilms[J]. Journal of Surgical Research, 2015, 199(2): 458-469
- [7] Vestby LK, Nesse LL. Wound care antiseptics-performance differences against *Staphylococcus aureus* in biofilm[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2015, 57: 22
- [8] Taitt CR, North SH, Kulagina NV. Antimicrobial peptide arrays for detection of inactivated biothreat agents[A]/Cretich M, Chiari M. Peptide Microarrays: Methods in Molecular Biology[M]. New York: Humana Press, 2009, 570: 233-255
- [9] Janssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(3): 491-511
- [10] Zhao Z, Mu ZL, Liu XW, et al. Expressions of antimicrobial peptides LL-37, human beta defensin-2 and -3 in the lesions of cutaneous tuberculosis and tuberculids[J]. Chinese Medical Journal, 2016, 129(6): 696-701
- [11] Yang Y, Choi H, Seon M, et al. LL-37 stimulates the functions of adipose-derived stromal/stem cells via early growth response 1 and the MAPK pathway[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2016, 7: 58
- [12] Henkel A, Tausch L, Pillong M, et al. Boswellic acids target the human immune system-modulating antimicrobial peptide LL-37[J]. Pharmacological Research, 2015, 102: 53-60
- [13] Wang GS, Mishra B, Epand RF, et al. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1838(9): 2160-2172
- [14] Wang GS, Hanke ML, Mishra B, et al. Transformation of human cathelicidin LL-37 into selective, stable, and potent antimicrobial compounds[J]. ACS Chemical Biology, 2014, 9(9): 1997-2002
- [15] Mishra B, Golla RM, Lau K, et al. Anti-staphylococcal biofilm effects of human cathelicidin peptides[J]. ACS Chemistry Letter, 2016, 7(1): 117-121
- [16] Zhou SS, Chao XG, Fei MM, et al. Analysis of *S. epidermidis* *icaA* and *icaD* genes by polymerase chain reaction and slime production: a case control study[J]. BMC Infectious Diseases, 2013, 13: 242
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2012: 1-150
- [18] Rohinishree YS, Negi PS. Effect of licorice extract on cell viability, biofilm formation and exotoxin production by *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 53(2): 1092-1100
- [19] Xing MX, Jia SM, Yuan P, et al. Inhibition of azithromycin on biofilms of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2012, 43(6): 553-559 (in Chinese)  
邢明勋, 贾生美, 袁鹏, 等. 阿奇霉素对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(6): 553-559
- [20] Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria[J]. Future Microbiology, 2015, 10(11): 1743-1750
- [21] Pasich E, Walczewska M, Pasich A, et al. Mechanism and risk factors of oral biofilm formation[J]. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2013, 67: 736-741
- [22] Dosler S, Karaaslan E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides[J]. Peptides, 2014, 62: 32-37
- [23] Parra-Ruiz J, Vidallac C, Rybak MJ. Macrolides and staphylococcal biofilms[J]. Revista Espanola de Quimioterapia, 2012, 25(1): 10-16
- [24] McLean DT, Linden GJ, Lundy FT. Antimicrobial activity of LL-37 and three truncated derivatives against Gram positive and Gram negative bacteria[J]. Regulatory Peptides, 2010, 164(1): 49
- [25] Hua X, Yuan XY, Tang X, et al. Human corneal epithelial cells produce antimicrobial peptides LL-37 and  $\beta$ -defensins in response to heat-killed *Candida albicans*[J]. Ophthalmic Research, 2014, 51(4): 179-186
- [26] Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, et al. The role of cathelicidin LL-37 in cancer development[J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2016, 64(1): 33-46
- [27] Haisma EM, de Breij A, Chan H, et al. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(8): 4411-4419
- [28] Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2: 128
- [29] Feng XR, Sambanthamoorthy K, Palys T, et al. The human antimicrobial peptide LL-37 and its fragments possess both antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Peptides, 2013, 49: 131-137