

细菌生物膜与耐药性相关性研究进展

史巧² 王红宁^{1*} 刘立³

(1. 四川大学生命科学学院 动物疾病防控生物工程研究中心 成都 610064)

(2. 四川农业大学资源环境学院 雅安 625014)

(3. 四川农业大学动物医学院 雅安 625014)

摘要: 细菌生物膜是一种包裹于细胞外多聚物基质中不可逆的黏附于非生物或生物表面的微生物细胞菌落。生物膜状态下的细菌相对其浮游状态具有显著增强的耐药性, 对人及动物细菌性感染具有重要研究价值。然而尽管动物细菌耐药性被广泛报道, 却很少涉及细菌生物膜与其之间的相关性, 本文综述了细菌生物膜的耐药机制并探讨了细菌生物膜与动物源性细菌耐药性的关系, 可作为研究细菌耐药性及控制动物产品安全的参考。

关键词: 细菌生物膜, 耐药性, 耐药机制, 动物细菌

Progress on the Relevance of Bacteria Biofilm to Antibiotic Resistance

SHI Qiao² WANG Hong-Ning^{1*} LIU Li³

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

(2. College of Natural Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

(3. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract: Bacterial biofilm is a biopolymer matrix-enclosed bacterial population adherent to each other and surfaces or interfaces. The organisms within biofilms are notorious for their resistance towards antibiotics compared to their free-living planktonic counterparts. Consequently, biofilms are of significant importance to both clinical and veterinary science. However, although antibiotic resistance of bacteria are widely reported in animals, their association with biofilms is rarely discussed. The aim of this review is to look at the mechanism of antibiotic resistance of bacterial biofilms and discuss the relevance between antibiotic resistance of animal bacteria and biofilms, besides this article can be seen as a reference in studying antibiotic resistance in bacteria and guaranteeing the safety of animal products.

Keywords: Bacterial biofilm, Antibiotic resistance, Mechanism of antibiotic resistance, Bacteria of animal origin

随着抗生素的广泛应用, 细菌对抗生素产生的耐药现象日益加重, 给临床抗感染治疗带来了极大

的挑战。传统观点认为细菌耐药性主要由三方面机制介导, 即药物吸收障碍和主动外排, 药物作用靶

位的改变及灭活酶、钝化酶的产生^[1]。然而许多现象表明体外药敏试验中对感染菌敏感的药物用于临床治疗却难以奏效。在对某些反复发作的人慢性感染病因研究中,日本学者小林宏行提出了细菌生物膜病(Bacterial Biofilm Disease)的观点,认为细菌对抗生素的耐药性不仅与耐药菌株的大量产生有关,亦与致病菌在体内形成生物膜有关^[2]。生物膜内的细菌对抗生素和宿主免疫系统的抗性很强,因而其一旦在体内形成,往往引起感染久治不愈和反复急性发作,这已逐渐引起国内外兽医学者的关注。目前,对动物细菌耐药性的报道多见于大量耐药菌株的出现,而对生物膜的形成对其影响研究较少,本文就细菌生物膜耐药机制及与动物细菌耐药性关系作一综述,可作为研究细菌耐药性及控制动物产品安全的参考。

1 细菌生物膜的耐药机制

细菌生物膜的形成使其生物学特征与浮游状态下存在显著差异,表现在环境的变化对细菌的影响大大降低,尤其是其对抗生素的敏感性大大下降,感染部位的细菌一旦形成生物膜,即使使用正常剂量成百倍的药物也不易治愈^[3]。生物膜耐药机制复杂,被认为是多因素综合作用的结果,主要包括以下几方面因素。

1.1 渗透障碍

生物膜内细菌密度高,细菌之间的空间狭小,并有大量胞外基质包裹,这样的三维结构形成一道屏障,抗生素在其中的扩散速度减慢,无法以有效浓度渗透至深部细菌之中,从而使药物难以发挥其杀菌作用。Stewart 等证实细菌生物膜的厚度与其耐药性存在线性关系^[4]。此外,生物膜负电荷的胞外脂多糖可与大量的抗生素分子结合,使达到细菌部位的药物浓度显著降低;同时许多抗生素水解酶可以固定在生物膜上,使进入膜内的抗生素被灭活。Anderl 等研究结果显示氨苄西林对生物膜的渗透性降低实际上是由于 β -内酰胺酶的作用,因为氨苄西林很容易通过由 β -内酰胺酶缺陷变异菌株形成的生物膜^[5]。

但有越来越多的证据表明,渗透障碍并不能解释生物膜的所有现象。如 Anderl 等发现尽管环丙沙

星和氨苄西林可以渗透整个缺乏 β -内酰胺酶的肺炎杆菌生物膜,细菌仍然对这些药物不敏感^[5]。

1.2 营养及氧气限制

生物膜内的细菌由于营养供应不足,处于饥饿状态,同时还有大量代谢废物堆积,故生长速度慢。分裂不活跃。由于细菌的代谢率降低,抗生素通过作用于代谢环节去影响细菌活性的概率也降低。Evans 等观察到生物膜状态和浮游状态的铜绿假单胞菌对环丙沙星的敏感性均随着其生长速度的升高而升高,但是在精确控制生物膜菌株的生长速度时,处于相同生长速度的生物膜菌株和浮游菌株的耐药性仍然有较大差别,因此单独用生长速度来解释生物膜细菌耐药性并不能得到圆满的结论^[6]。

氧供不足也被认为有助于生物膜耐药性的产生。Walters 等研究显示环丙沙星和妥布霉素仅在生物膜与空气的界面和氧气浓度高的区域发挥抑菌作用^[7]。Yoon 等研究显示铜绿假单胞菌在厌氧条件下能形成健全的生物膜,并且其形成需要特定基因表达产物的参与,这提示了氧供不足能引起膜内细菌生理学和表型变化,从而导致耐药性增加^[8]。

1.3 生物膜表型的表达

生物膜细菌与浮游菌相比,出现了生物膜环境所特有的基因表达模式,即对生长表面的粘附触发了部分细菌亚群基因表达的变化,使其生物学行为也随之改变,这称为生物膜表型。生物膜特有的表型能够激活其耐药机制。目前从 mRNA 水平和蛋白水平寻找生物膜状态和浮游状态下基因表达的差别,是生物膜研究的一个热点。

白色念珠菌拥有的编码外排泵的 MDR 基因和耐药性相关基因——CDR 基因家族,在生物膜中表达均有增强,可能引起细胞膜上外排泵数目增多或活性增强,导致生物膜中的菌株出现耐药性。而人工敲除细菌中的这些耐药性基因,所培养的浮游菌株耐药性下降,生物膜菌株耐药性却没有明显下降,表明耐药性并不是单一的耐药性基因所控制的^[9]。

另有研究表明,生物膜中有部分表型变异株在高抗生素浓度下能照常生长。Drenkard 等发现,铜绿假单胞菌中存在一种调节蛋白(PvrR),该蛋白控制铜绿假单胞菌对抗生素敏感和耐药的转化。这种表型变化通常是可逆的,并且高频率地随机发生,使生物膜具有较高的异质性,有利于其应对突发的

环境变化^[10]。Deziel 等提出表型变化调控着细菌在生物膜和浮游状态之间的转化, 它能保证当条件适宜时, 细菌能重新启动生物膜的形成^[11]。

1.4 顽固耐药菌

顽固耐药菌(persister)也被认为与生物膜的高耐药性有关。Brooun 等研究证明一定浓度抗生素能杀死生物膜内大多数细菌, 但即使增加药物浓度, 仍有少部分细菌存活^[12]。Spoering 和 Lewis 实验证明处于静止阶段的浮游菌和生物膜内大部分细菌的耐药性相似, 而一小部分顽固耐药菌是生物膜难以清除的主要原因^[13]。Harrison 等也有类似的发现, 生物膜在暴露于阳离子杀菌剂的前 2 h~4 h 表现出两倍于浮游菌的耐药性, 但两种状态的细菌 27 h 后在同一浓度下被杀灭, 他们认为这是由于少数顽固耐药菌的存在导致出现该现象^[14]。但目前对其确切的耐药机制仍不清楚, Keren 等得出它们并没有可遗传的耐药性传给子代, 生物膜破坏后即恢复对抗生素的敏感性^[15]。

Lewis 等提出程序化细胞死亡(Programmed Cell Death, PCD)假说, 认为顽固耐药菌可能正是因为存在 PCD 程序缺陷, 所以在抗生素引起细胞损伤而触发 PCD 造成大部分细菌死亡时, 顽固菌仍能存活, 从而增加了生物膜的耐药性^[16]。

1.5 细菌传感效应

细菌传感效应(Quorum sensing, QS)被认为在生物膜耐药性上起着作用。传感效应是同种或不同种细菌通过各种信号传导系统对它们当前所处环境、群体密度的感知、交流, 使菌体间相互协调生理活动以趋利避害。铜绿假单胞菌的 QS 包括 las 系统和 rhl 系统, 两系统分别包括转录激活蛋白 LasR 和 rhlR 及催化各自信号识别分子合成的 LasI 和 rhlI。Davies 等发现由 lasI 突变株形成的生物膜对 SDS 敏感性增加, 且形成的生物膜不稳定^[17]。Shih 等证明 LasI-rhlI 突变株形成的生物膜具有比野生型生物膜更高的卡那霉素敏感性^[18]。相反地, Brooun 等的结果显示铜绿假单胞菌 lasI 突变株与野生株形成的生物膜对 SDS、氧氟沙星、妥布霉素的耐药性并没有差异, 作者将其与此前结果的不一致归结为所用的培养基不同^[19]。

Yarwood 等报道金黄色葡萄球菌野生株形成的生物膜对利福平、苯唑西林均耐药, 而 QS 突变株形成的生物膜对利福平敏感, 对苯唑西林耐药。而在

浮游状态下, 该突变株和野生株对两种抗生素的敏感性无显著差异^[20]。

1.6 普遍应激反应

也有人提出生物膜内细菌的耐药性与由生长速度启动的普遍应激反应(General stress response)有关, 应激反应导致细菌的生理学改变, 使其在各种环境下得到保护。 σ 因子 rpoS 是一种普遍应激反应的调控因子, 能激活一系列基因的转录, 使细菌在营养匮乏条件下维持生活力。Xu 等报道铜绿假单胞菌生物膜内细菌的 σ 因子 rpoS 相对于静止阶段的浮游菌表达水平高, 提示生物膜内的环境如营养缺乏或有毒代谢产物的堆积, 激活了 σ 因子 rpoS 的表达, 使细菌发生生理变化以抵抗环境压力和抗生素作用^[21]。Adams 等发现 rpoS 表达阳性的大肠杆菌生物膜有非常高的密度和活菌数量, 而 rpoS 缺失的大肠杆菌不能形成正常的生物被膜^[22]。然而 Whiteley 等用 rpoS 突变株形成的生物膜却具有比野生株生物膜更强的对妥布霉素的耐药性, 故 rpoS 在生物膜的耐药性中所起的作用还需进一步研究^[23]。

2 生物膜与动物细菌耐药性的相关性

细菌生物膜和人的一些反复发作且难以控制的慢性感染的相关性早已被证实, 兽医研究者由此联想到一些与生物膜所致人类感染症状相似的动物疾病也可能归因于细菌生物膜。目前一些重要的动物病原菌, 如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、假结核棒状杆菌等已被证明能够形成生物膜结构^[24]。国外一些兽医学者基于组织病理学和组织内细菌的超微结构, 提出细菌生物膜能引起多种动物疾病, 如肺炎、肝脓肿、淋巴结炎、肠炎、伤口感染和奶牛乳腺炎^[24-26]。这种观点得到了很多现象和实验结果的支撑, 已被普遍接受。

为了研究生物膜与动物细菌耐药性的关系, Olson 等用卡尔加里生物膜装置(Calgary Biofilm Device, CBD)来形成生物膜以模拟体内环境, 筛选对致病菌敏感的抗生素, 他们引入了一个新的指标, 即最小生物膜清除浓度(Minimal Biofilm Eradication Concentration, MBEC), 实验证明以 MBEC 作为评判抗生素是否有效的指标能显著提高自然和人工感染的治愈率。他们从牛、羊、猪、鸡、火鸡分离了不同病原菌, 针对革兰氏阴性、阳性菌分别用 7 种不同的临床常用抗生素检测细菌在浮游和生物膜状

态下的耐药性, 并对 MIC 和 MBEC 进行比较。结果显示, 由化脓放线菌、金黄色葡萄球菌、猪葡萄球菌、无乳链球菌、肾棒状杆菌和假结核棒状杆菌形成的生物膜不能被所选抗生素杀灭, 然而其在浮游状态下却对低浓度的同样抗生素敏感。两种状态下的停乳链球菌和猪链球菌对青霉素、头孢噻吩、氯唑西林、氨苄西林和土霉素均呈现敏感。浮游状态的大肠杆菌对恩氟沙星、庆大霉素、土霉素和甲氧苄啶/磺胺多辛敏感, 恩氟沙星和庆大霉素也是对大肠杆菌生物膜最有效的药物。沙门氏菌和铜绿假单胞菌的临床分离株在浮游状态下对恩氟沙星、庆大霉素、氨苄西林、土霉素和甲氧苄啶/磺胺多辛敏感, 但当形成生物膜后, 它们仅对恩氟沙星敏感。巴斯德杆菌和溶血性曼氏杆菌在两种状态下对不同抗生素敏感性相似, 且对大部分受试药物敏感。两种状态的睡眠嗜血杆菌对全部 7 种针对革兰氏阴性菌的抗生素敏感^[24]。

流行病学调查揭示抗生素对奶牛乳腺炎的治愈率在 0% 到 80% 之间, 对年老, 处于泌乳期和具有较高体细胞数(Somatic cell counts, SCC)的病牛的治愈率较低, 尤其对慢性感染的病牛几乎无效。研究显示超过 40% 的奶牛乳腺炎是未彻底治愈的首次感染的反复发作^[27], 对临床分离的金黄色葡萄球菌进行基因检测, 发现与生物膜形成有关的 *ica* locus 具有相当高的检出率^[28], 因此其复发感染被认为是细菌生物膜所致。

Melchior 等对分离自临床的 6 株金黄色葡萄球菌的三种生长状态分别进行了最低抑菌浓度 MIC(按 CLSI 推荐的肉汤微量稀释法), 生物膜最低抑菌浓度(Biofilm MIC, BMIC)和最小生物膜清除浓度 MBEC 的测定。其中 BMIC 为从生物膜脱离附着释放出的游离菌经 37°C 培养 24 h 后测得的 MIC, 而 MBEC 通过将一定浓度抗生素作用后的生物膜超声破坏并在 37°C 下培养 20 h 测定。所用抗生素有青霉素、阿莫西林、氯唑西林、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢唑肟、林可霉素、吡利霉素、泰洛星、新霉素、庆大霉素、复方新诺明、氟苯尼考、达氟沙星以及氯唑西林/青霉素、新霉素/青霉素。结果显示对大部分抗生素 MIC 和 BMIC 之间呈正相关关系, 1 株青霉素耐药菌对青霉素和阿莫西林的 BMIC 比相应 MIC 高出 9 个梯度, 为此两值的最大差异; 所有抗

生素的 MBEC 相对 BMIC 和 MIC 高出 100~1000 倍, 且常超出检测限 2048 $\mu\text{g/mL}$, 除青霉素敏感菌对青霉素表现出相对较低的 MBEC 外, 对其余抗生素如氯唑西林和吡利霉素具有 4 倍乃至更高 MBEC 敏感性的菌株, 其 MIC 并不比其他株低。

该实验表明若按 CLSI 推荐方法得出结论为除 4 株菌对青霉素和阿莫西林耐药以外, 所有菌株对所用抗生素均敏感, 但实际上大多数菌株所形成的生物膜仅能在一些抗生素相当高的浓度下被清除, 而该浓度远远超出抗生素在体内所能达到的极限值, 反映了临床分离的金黄色葡萄球菌形成生物膜后, 其耐药性显著增高^[29]。

3 问题与展望

对细菌生物膜与动物细菌耐药性关系的认识给我们带来启示, 在临床上判断抗菌药物治疗效果应依据实际造成感染的细菌状态来确定。目前 CLSI 肉汤微量稀释法仅仅对浮游状态的细菌所做的药敏实验, 并不能评估抗生素对生物膜细菌的敏感性, 故不能准确指导对由生物膜引发感染的临床用药。所以, 生物膜形成程度与临床感染的关系, 抗生物膜治疗的有效性标准, 是今后的研究方向。

目前人们已认识到一些动物感染是由细菌生物膜引起, 但许多有关生物膜细菌的机理问题还有待解决。更好地了解生物膜结构及其中细菌的相互关系, 将有助于发现针对生物膜结构的治疗方法, 达到彻底治疗的目的。

参考文献

- [1] 张永利, 万献尧. 细菌耐药性研究进展. 中国医师杂志, 2004, 6(12): 1721-1722.
- [2] 小林宏行. 细菌菌膜的基础与临床. 中国临床药理学杂志, 1999, 15: 299-307.
- [3] 黄晓群. 细菌生物膜及其相关感染性疾病的研究进展. 右江医学, 2007, 35(1): 95-96.
- [4] Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1996, 40: 2517-2522.
- [5] Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44: 1818-1824.
- [6] Evans DJ, Allison DG, Brown MR, et al. Susceptibility of

- Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J Antimicrob Chemother*, 1991, **27**: 177–184.
- [7] 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 Agents Chemother*, 2003, **47**: 317–323.
- [8] Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell*, 2002, **3**(4): 593–603.
- [9] Iwata C, Nakagaki H, Morita I, *et al.* Daily use of dentifrice with and without xylitol and fluoride: effect on glucose retention in humans *in vivo*. *Archives of Oral Biology*, 2003, **48**(5): 389–395.
- [10] Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 2002, **416**: 740–743.
- [11] Deziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 1195–1204.
- [12] Brooun A, Liu S, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, **44**: 640–646.
- [13] Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 6746–6751.
- [14] Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 2005, **7**: 981–994.
- [15] Keren I, Kaldalu N, Spoering A, *et al.* Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **230**: 13–18.
- [16] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, **45**: 999–1007.
- [17] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998, **280**: 295–298.
- [18] Shih PC, Huang CT. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2002, **49**: 309–314.
- [19] Brooun A, Liu S, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44**: 640–646.
- [20] Yarwood JM, Barrells DJ, Volper EM, *et al.* Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 1838.
- [21] Xu KD, Franklin MJ, Park CH, *et al.* Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **199**: 67–71.
- [22] Adams JL, Mclean RJC. Impact of rpoS deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(9): 4285–4287.
- [23] Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, *et al.* Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 2001, **413**: 860–864.
- [24] Olson ME, Ceri H, Morck DW, *et al.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*, 2002, **66**: 86–92.
- [25] Percival SL, Bowler PG. Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds*, 2004, **16**: 234–240.
- [26] Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *The Veterinary Journal*, 2006, **171**: 398–407.
- [27] Hillerton JE, Kliem KE. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *Journal of Dairy Science*, 2002, **85**: 1009–1014.
- [28] Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, 2003, **92**: 179–185.
- [29] Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 2006, **53**(7): 326–332.