

激光共聚焦扫描显微镜在抗菌机理研究中的应用

游雪娇 李良秋* 马连营 彭斐元

(广东省微生物研究所 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东 广州 510070)

摘要: 激光共聚焦扫描显微镜采用激光光源、共聚焦技术和点扫描技术,使其分辨力较传统光学显微镜大为提高。与其他的生物学技术相配合,可定性、定量、定位地检测组织细胞内的多种生化成分。它具有的活细胞动态监测、断层扫描及三维图像重建等功能,使其在抗菌机理研究、尤其是抗生物膜研究中得到大量的应用。本文就激光共聚焦扫描显微镜在抗菌剂作用位点,抗菌剂对微生物细胞膜,微生物生理代谢,以及微生物生物膜形成与结构的影响等研究中的应用做一综述。

关键词: 激光共聚焦扫描显微镜, 抗菌, 机理, 生物膜

Applications of confocal laser scanning microscope in the research of antimicrobial mechanism

YOU Xue-Jiao LI Liang-Qiu* MA Lian-Ying PENG Fei-Yuan

(Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: Confocal laser scanning microscope (CLSM or LSCM) offers higher resolution than traditional optical microscopy due to use of laser illumination source, pinhole spatial filter and point scanning technology. In combination with other biological technologies, CLSM enables the qualitative and quantitative characterization of various biochemical ingredient *in situ*. As CLSM is a valuable tool for observing living cells, obtaining scan-images of thick specimens at various depths and three-dimensional reconstructions, it has great application in the research of antimicrobial and anti-biofilm. This paper concerns the applications of CLSM in the cellular distribution of microbicides and its effect on cell membrane, metabolic pathways, as well as the formation and structure of biofilm.

Keywords: Confocal laser scanning microscope, Antimicrobial, Mechanism, Biofilm

自然界的有害细菌、真菌和病毒等微生物是人类遭受传染、诱发疾病的主要原因。杀灭或是抑制微生物(包括细菌、真菌、衣原体、立克次体、病毒甚至原生动物)的抗菌剂种类多达数百上千种。不同的抗菌剂对同一种病原菌有不同的抗菌作用机

理和有效性,同一种抗菌剂对于不同的病原菌也有不同的抗菌作用机制和抑制范围。因此,全面、深层次的抗菌机理研究对进一步改善抗菌剂的有效性,研究出长效广谱、高效安全的抗菌剂有着重要的意义。

*通讯作者: ✉: liliangqiu1010@163.com

收稿日期: 2014-08-21; 接受日期: 2014-12-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-12

激光共聚焦扫描显微镜(Confocal laser scanning microscope, CLSM or LSCM)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种现代化的光学显微镜。与普通光学显微镜不同的是: CLSM 以单色性非常好的激光作为光源, 采用共聚焦技术消除了透镜的色差和球差, 并运用点扫描技术, 使标本上每一点的图像避免了相邻点的衍射光和散射光的干扰, 从而使显微镜的分辨力得以提高。辅以各类荧光探针或荧光染料与被测物质特异性结合, 用激光激发荧光探针或荧光染料, 扫描得到高分辨率、高对比度的荧光图像, 从而定性、定量、定位地检测组织细胞内的多种生化成分。在抗菌机理研究中, CLSM 已被广泛应用于细胞膜结构与通透性、细胞的生理代谢、抗菌剂作用位点以及生物膜形成与结构等多方面的研究中。

1 抗菌剂对细胞膜的作用

细胞膜在保持相对稳定的胞内环境, 维持微生物的正常生命活动中发挥至关重要的作用。抗菌物质可通过破坏膜结构、改变膜电位、增加膜通透性、导致胞内物质泄漏等作用, 达到杀灭或是抑制微生物的目的^[1-3]。而对于细菌而言, 细胞膜还是物质与能量代谢的场所, 抗菌物质还对膜上的呼吸链进行破坏, 使 ATP 的合成减少或停止等^[4-5]。

1.1 膜结构

细胞膜主要由磷脂和蛋白质构成。其中, 磷脂形成双分子层, 亲水端朝向细胞外液或胞质, 疏水的脂肪酸烃链则彼此相对, 形成膜内部的疏水区; 蛋白质则区域性地分布于膜的内外表面或嵌入磷脂双分子层。细胞膜的完整结构及渗透性的完整是其实现细胞与环境的物质、能量和信息交换等功能的保障。抗菌物质导致细胞膜的完整结构或渗透屏障被破坏直至膜的透化, 细胞内容物大量外流、胞外水分大量内流, 使细胞内渗透压发生改变, 最后菌体失去正常胞膜保护而死亡^[2]。

脂质膜特异性荧光染料 FM4-64 为无色的水溶性苯乙烯类复合物, 由一条亲脂的尾部的一个带正

电荷的头部经双键相连而成, 亲脂尾部插入脂双层的外叶中而显示较强的荧光, 头部则阻止其进一步穿越脂双层, 因此可特异性地标记细胞膜。Sharma 等^[6]利用 FM4-64 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)细胞膜进行染色, CLSM 观察发现抗菌肽 N2、N4 与 N5 对细胞膜结构均无明显影响。在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧; 而凋亡或坏死的细胞中, 膜磷脂失去平衡, 细胞膜上磷脂酰丝氨酸会从细胞膜内侧外翻, 暴露于细胞外环境中。膜联蛋白(Annexin-V)是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 与磷脂具有高度亲和力, 它可以与转移到膜外的 PS 结合, 因此可用异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)等荧光染料标记的 Annexin-V 作为荧光探针, 观察抗菌作用引起的细胞膜 PS 的表面化。Chen 等^[7]研究发现茴香(*Anethum graveolens* L.)籽精油可引发白色念珠菌(*Candida albicans*)凋亡, CLSM 结合 Annexin-V/FITC 染色的结果表明: 经 0.625 mL/L 茴香籽精油处理 12 h 后, 55% 的菌体细胞膜 PS 表面化。Annexin-V 与只能穿透破损细胞膜的核酸染料碘化丙啶(Propidium iodide, PI)结合使用, 还能区分正常细胞 V(-)PI(-)、早期凋亡细胞 V(+)PI(-)、晚期凋亡细胞及坏死细胞 V(+)PI(+)。Kang 等^[8]将 16 mg/L 麦角苜酯处理 12 h 后的克柔念珠菌(*Candida krusei*)进行 Annexin-V/FITC 和 PI 双染, 经 CLSM 观察到细胞膜 PS 外翻。

在抗菌机理研究中, 常运用具有固定化学成分的单层脂膜、双层脂膜及脂质体等模拟细胞膜, 研究抗菌物质对膜结构及功能的影响^[9-11]。Torrent 等^[12]先用 Alexa Fluor 488 标记抗菌蛋白、Vibrant DiI 标记脂质体, 再用共聚焦显微镜观察脂质体构象变化, 结果表明: 蛋白质 RNase 3 和 RNase 7 对中性的纯二油酸甘油磷脂酰胆碱(DOPC)脂质体无作用, 但能破坏摩尔比为 3:2 的 DOPC/DOPG (二油酸甘油磷脂酰甘油)脂质体构象、引起脂质体聚集。Yu 等^[11]用磷脂膜染料 NBD-PE 标记脂质体、TMR

(Tetramethylrhodamine)标记抗菌肽 V4, 经 LSCM 观察发现: 抗菌肽可破坏棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG)脂质体的双分子层结构, 而对棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)脂质体无影响。Dubreil 等^[13]利用 CLSM 观察了蛋白质 Puroindoline-a 对单分子层磷脂膜的作用, 结果显示: BODIPY 标记的单分子层磷脂膜存在液体扩张相(Liquid expanded phase, LE)和液体压缩相(Liquid-condensed phase, LC), 分别为有荧光的亮区和无荧光的暗区。5-TAMRA (5-Carboxytetramethyl-rhodamine) 标记的 Puroindoline-a 结合于二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)的 LE 区, 导致 LC 区的融合、形状无规则化; 对于二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)单层膜, Puroindoline-a 分布于 LE 区与 LC 区中的圆锥形区, 使 LC 区平均直径变小、且直径分布变宽。

1.2 膜通透性

细胞膜为选择透过性膜, 而当抗菌物质作用于细胞膜, 引起膜通透性改变, 导致细胞膜失去对物质的特异选择性。因此, 可通过检测抗菌处理后胞外物质的流入和胞内物质的泄露, 间接反映抗菌物质对细胞膜通透性的影响。

1.2.1 胞外物质流入: 抗菌机理研究中, 应用 CLSM 观察抗菌剂处理后荧光染料等胞外物质的流入情况, 为分析抗菌物质对细胞膜通透性影响提供了有力的证据。常用的荧光染料有 PI、FITC-dextran、SYTOX Green 等。

Maurya 等^[14]将白色念珠菌与半致死浓度的抗菌肽(IJ2、IJ3 和 IJ4)及 PI 共培养, 观察不同处理时间后细胞膜通透性的改变, 结果表明: IJ4 仅作用 5 min 就可破坏细胞膜的完整性, 导致 PI 流入胞内; 3 种抗菌肽处理后的胞内 PI 荧光强度均随处理时间延长而上升。Jiang 等^[15]利用 PI 染色与 CLSM 观察, 分析了光敏剂竹红菌乙素(Hypocrellin B)在光动力作用下, 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)膜通透性的影响, 研究发现: 菌体在含 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 竹红菌乙素的培养液中培养 60 min, 并经 470 nm 激光光照处理(能量密度为 0.3 J/cm²)后, 菌体的细

胞膜通透性显著增加。利用 PI 与其他荧光染料(如: SYTO9^[16]、DAPI^[17]、Hoechst 33342^[18]、FITC^[19]、Fluorescein^[5]等)对细胞进行双染, 结合 CLSM 观察分析, 还可进一步反映菌体的死活比例。

将抗菌肽、标记蛋白质的 FITC-dextran (100 kD, 250 mg/L)与结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)共培养, CLSM 观察分析抗菌肽对细胞膜的作用, 结果表明: 随着处理时间的延长, 菌体内荧光强度增强, 说明多肽引起菌体细胞膜破损^[20]。不同分子量的 FITC-dextran 有着不同的粒径, 如分子量为 3.9 kD 的 FITC-dextran 粒径约为 2.8 nm、9.9 kD 的约为 4.6 nm、19.8 kD 的约为 6.6 nm。因此, 用一系列不同分子量的 FITC-dextran 分别对抗菌物质处理的菌体进行染色, 分析染料是否进入菌体胞内, 可进一步确定膜孔洞的大小^[21-22]。Park 等^[9]发现抗菌肽 Pseudin-2 可破坏大肠杆菌和白色念珠菌细胞膜的完整性, 通过 CLSM 观察菌体对不同粒径染料的摄入情况, 确定抗菌作用形成的孔洞小于 4.6 nm。

Lee 等^[23]比较了大肠杆菌经 3 种抗菌肽处理后对核酸染料 SYTOX Green 的摄入情况, 间接反映膜通透性的变化, 结果表明 HPA3 和 HPA3P 均可引起细胞膜通透性的增加, 而 HPA3P2 则对细胞膜通透性无影响。Li 等^[24]利用 SYTOX Green 染色联合 CLSM 观察重组蛋白 rEARLI1 对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞膜通透性的影响, 发现 rEARLI1 可提高细胞膜的通透性。Wong 等^[25]研究发现 5 $\mu\text{mol/L}$ 的抗菌肽 LL13-37 可使酵母相和菌丝相的白色念珠菌细胞膜通透性增加, 导致 SYTOX Green 的流入。

1.2.2 胞内物质泄漏: 钾离子、磷酸盐、ATP、核酸、蛋白质等胞内物质的泄漏是细胞膜受损的有力证据^[1,17,21,26-28]。利用荧光探针结合 CLSM 分析胞内蛋白质的研究已见报道。Sanpui 等^[29]研究了壳聚糖/纳米银复合物 (Chitosan-Ag-nanoparticle composite)对表达绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的重组大肠杆菌的抗菌作用, CLSM

的结果表明抗菌处理后菌体形态塌陷、绿色荧光蛋白泄露, 细胞膜通透性增加。Fang 等^[30]利用蛋白荧光染料 FITC 标记菌体、CLSM 观察后, 结合图像分析软件分析胞内荧光强度变化, 发现: 纳米材料处理后大肠杆菌细胞膜通透性增加, 导致胞内蛋白质的流失。

1.2.3 胞内游离钙浓度: 正常细胞内游离钙浓度极低, 与胞外钙离子浓度相差近 4 个数量级。细胞内游离 Ca^{2+} 的维持和改变是受细胞对 Ca^{2+} 的跨膜运输影响。因此, 在抗菌机理研究中, 细胞内游离钙浓度的变化被认为是细胞膜通透性发生改变的表现^[31-32]。应用 CLSM 结合特异性钙离子荧光探针标记, 可精确、直观地观察到细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化, 使用的 Fura-2、Fluo-3 等荧光探针多为 Ca^{2+} 螯合剂, 不与 Ca^{2+} 结合时不发荧光, 通常也不能进入细胞膜, 只有与乙酰甲酯(AM)相连方可进入细胞内, 被细胞内酯酶水解后并与胞内游离钙结合后发出荧光。马海乐等^[33]将脉冲磁场处理的金黄色葡萄球菌细胞经钙离子荧光探针 Fura-2/AM 染色, 用 CLSM 观察到胞内光点显著增多、光点荧光强度明显增大, 大量胞外钙离子跨膜进入胞内。马晟利等^[34]用 Fluo-3/AM 负载牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)细胞内游离钙离子, 在 CLSM 下观察 Ca^{2+} 荧光强度变化, 结果表明血链球菌经细菌素作用后, 菌体细胞内钙离子浓度显著降低。

1.3 膜电位

Na^+ 、 K^+ 等离子在细胞内外的不均等分布及选择性的透膜移动, 是形成膜电位的基础。维持正常新陈代谢的细胞, 膜电位总是保持在一定的内负外正的水平上。而细胞膜的通透性和离子移动的显著变化, 则导致膜电位发生改变。抗菌机理研究中, 常利用荧光探针标记的方法分析膜电位变化, 常用的染料有: DiBAC₄(3)[Bis-(1,3-Dibutylbarbituric acid) trimethineoxonol]和 DiSC₃(5)[3,3'-Dipropylthiacarbocyanine]^[35-37]。CLSM 联合荧光探针分析膜电位的研究也有报道, 使用的探针为 DiBAC₄(3)。DiBAC₄(3)

是亲脂性的膜电位敏感的阴离子荧光探针, 由于其具有的阴离子特性, 使它会随着细胞膜电位的变化进出细胞膜, 保持膜内外电荷的动态平衡, 因此, 可通过检测荧光强度变化来确定细胞膜是去极化还是超极化。Strathmann 等^[38]用 DiBAC₄(3)标记金黄色葡萄球菌细胞膜, 经 CLSM 观察发现银离子导致细胞内荧光强度增加, 说明膜电位增加、细胞去极化。

2 抗菌剂对代谢的影响

2.1 呼吸活性

呼吸作用是生物体重要的产能代谢之一, 呼吸作用的抑制或终止则可导致生命活动的停止。呼吸作用的抑制可通过氧消耗的减少或 ATP 合成水平下降等间接指标来反映^[5,7,39], 也可利用特异性荧光染料直接地表征抗菌物质对呼吸活性的影响^[40-42]。

5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) 是利用荧光标记方法分析细菌呼吸活性时最为常用的荧光染料^[40-41], 其在菌体细胞内可通过电子传递链还原形成易被检测的红色荧光沉淀物质 CTC (CTC-Formazan)。Chávez de Paz 等^[43]将胶原蛋白处理后的生物膜用 CTC 染色, 经 CLSM 分析生物膜中菌体的呼吸作用, 结果表明: 胶原蛋白对粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*)、咽峡炎链球菌 (*Streptococcus anginosus*) 及格氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*) 生物膜中的菌体呼吸活性均有显著的抑制作用, 呼吸活性均低于对照组的 30%。

真核微生物的呼吸链位于线粒体内膜上, 在真菌的抗菌机理研究中, 常利用线粒体特异性荧光探针标记结合 CLSM 观察分析线粒体分布与膜电位的变化。Shi 等^[44]将胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 孢子与四硼酸钾共培养, 经线粒体特异性荧光探针 MitoTracker® Orange CMTMRos 标记, CLSM 观察结果表明: 随着四硼酸钾处理时间的延长, 孢子中线粒体明显减少; 处理 8 h 后, 仅

在细胞边缘分布少量线粒体。Wong 等^[25]利用核酸染料 SYTOX Green 和线粒体特异性荧光探针 MitoTracker deep red 对白色念珠菌菌丝进行双染, CLSM 观察发现抗菌肽 LL13-37 可破坏菌丝中线粒体。Troppens 等^[45]发现抗生素 DAPG (2,4-Diacetylphloroglucinol) 导致粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) 萌发孢子中线粒体的形态及膜电位的变化, 其中 CLSM 结合荧光探针 Rhodamine 123 标记的结果显示: DAPG 引起细胞内的荧光下降, 至 10 min 时, 荧光完全消失, 这种变化趋势与氧化磷酸化和 ATP 合成过程的解偶联剂 CCCP (Carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone) 相似。

2.2 活性氧自由基

活性氧(Reactive oxidative species, ROS)是指生物体内与氧化代谢有关的含氧自由基和不以自由基形式存在的具有高活性的中间产物。ROS 在生物体内参与信号转导、调控基因表达、参与免疫反应, 但过量的 ROS 可对生物膜以及蛋白质、脂类、核酸等生物大分子造成氧化损伤。已有的报道显示, 部分抗菌物质可通过形成过量 ROS, 造成氧化损伤, 导致机体破坏或死亡^[42,46-47]。

抗菌机理研究中, 细胞内总 ROS 浓度的检测常利用荧光探针标记的方法, 使用的荧光探针有: 2',7'-Dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)、Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) 等。其中荧光探针标记联合 CLSM 分析 ROS 时, DCFH-DA 及其类似物最为常用。DCFH-DA 本身无荧光, 自由进入细胞内后被酯酶水解, 生成不能通透细胞膜的 DCFH, 无荧光的 DCFH 再被细胞内的活性氧化生成有荧光的 DCF, 检测 DCF 的荧光即可反映细胞内活性氧的水平。Maurya 等^[14]将白色念珠菌经抗菌肽 IJ2、IJ3 与 IJ4 处理后, DCFH-DA 标记结合 CLSM 观察的结果表明: 菌体细胞内 ROS 显著增加。Wi 等^[48]利用荧光探针标记 DCFH-DA 发光二极管(Light emitting diode, LED)照射后的糠秕马拉色菌(*Malassezia furfur*)和合轴马拉色菌(*Malassezia sympodialis*)菌体细胞内的 ROS, CLSM 观察显示两

种波长的 LED 照射均导致菌体内的荧光值升高, 且 392.5±1 nm 处理组的荧光强度高于 415±2 nm 处理组, 流式细胞仪定量分析也得到相同的结果。Wong 等^[25]的研究发现: 白色念珠菌经抗菌肽 LL13-37 处理、Carboxy-H₂DCFDA 荧光染色后, 细胞内的荧光强度大大高于对照组, 说明抗菌肽 LL13-37 导致细胞内产生大量 ROS。

2.3 核酸

核酸是生命最基本的物质之一, 具有贮存遗传信息和传递遗传信息等非常重要的生物功能。抗菌物质对核酸的破坏是抗菌物质发挥抗菌作用的途径之一, 其阻断 DNA 复制、RNA 合成, 使细胞的生长繁殖受到抑制, 最终导致菌体的死亡^[49]。

DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) 是核酸特异性染料, 且优先染双链 DNA, 它与小沟槽内的 AT 碱基对结合, 产生比自身强二十多倍的荧光, 其常用于细胞核染色质的形态学分析。Thibane 等^[50]研究了多种多不饱和脂肪酸对白色念珠菌和杜氏假丝酵母(*Candida dubliniensis*)生物膜中的菌体核酸的影响, DAPI 染色和 CLSM 观察的结果表明: 经 C18:4 n-4、C20:5 n-3 和 C22:5 n-3 处理后, 菌体中的荧光强度大大升高, C18:2 n-6 处理组的荧光强度变化较小。原核微生物的核区与原核微生物的细胞核有着较大的不同, 其无核膜结构、由一个大型环状双链 DNA 和少量蛋白质组成。因此, 利用 DAPI 染色和 CLSM 观察抗菌物质对原核微生物 DNA 破坏的结果不同于真核微生物, 表现为荧光强度的下降。Kumar 等^[51]将工程化纳米颗粒 ZnO 和 TiO₂ 处理后的大肠杆菌经 DAPI 染色和 CLSM 观察, 发现菌体内荧光强度下降、DNA 裂解。

脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)是检测细胞凋亡过程中细胞核 DNA 断裂常用的一种方法。正常或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 因而没有 3'-OH 形成。凋亡细胞中染色体 DNA 双链断裂或单链断裂而产生大量的黏性 3'-OH 末端, 可

在脱氧核糖核苷酸末端转移酶的作用下, 将荧光染料标记的脱氧核糖核苷酸结合到 DNA 的 3'-末端, 从而可通过分析荧光进行凋亡细胞的检测。Kang 等^[8]利用 TUNEL 法分析麦角苜酯对克柔念珠菌核酸 DNA 的作用, CLSM 直观地观察到 16 mg/L 处理组胞内呈现明显的荧光, 说明 DNA 断裂; 流式细胞仪定量分析结果显示: DNA 断裂的菌体比例随着麦角苜酯浓度的增大而升高, 其中 16 mg/L 处理组的 DNA 断裂的菌体比例达到 91.3%。

单细胞凝胶电泳技术 (Single cell gel electrophoresis, SCGE), 又称为彗星实验 (Comet assay), 其用 Ethidium bromide 等荧光染料标记 DNA, 利用电场使损伤的 DNA 从核内溢出, 形成与细胞核“头部”相区别的“尾部”, 并依据“彗星”的多少、“彗尾”的长度及荧光强度等指标分析 DNA 损伤程度。SCGE 与 CLSM 的联合使用可直观、精确地测定单个细胞 DNA 的损伤程度。Ibrahim 等^[52]分析金属铜对洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) DNA 的作用, SCGE 结合 CLSM 的结果显示: 处理时间为 1 h 时, 大量菌体 DNA 发生明显拖尾, 说明 DNA 严重受损。Tamboli 等^[53]的研究结果表明: 纳米银对大肠杆菌的 DNA 有破坏作用, 而对鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌无影响。

在真核细胞中, 组蛋白和 DNA 以核小体 (Nucleosome) 的形式构成染色质的基本结构单位。Palma-Guerrero 等^[32]以表达融合蛋白 (组蛋白 H1-GFP) 的粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*) 孢子为研究对象, 通过 CLSM 观察融合蛋白在胞内的表达情况, 反映壳聚糖对粗糙脉孢霉核小体的作用, 实验结果表明: 0.1 g/L 的壳聚糖处理 3 min 后, 细胞膜破损, PI 流入细胞内, 细胞内可见红色荧光, 而由于细胞核受损, 绿色荧光基本消失。

2.4 分裂繁殖

细胞分裂是细菌繁殖的基本过程, 其中关键蛋白——丝状温度敏感蛋白 Z (FtsZ) 在 GTP 的参与下

最早在细胞中部聚合成环状骨架 Z 环, 其他相关蛋白再与之结合, 从而引发并控制细胞的分裂过程^[54]。抗菌物质可通过对 FtsZ 的作用, 有效抑制细胞分裂, 进而抑制细菌的生长繁殖。Keffner 等^[55]将 FtsZ 与黄色荧光蛋白 (Yellow fluorescent protein, YFP) 融合表达的质粒转化大肠杆菌, 通过 CLSM 观察 Chrysopaentin A 和 Hemi-chrysopaentin 对大肠杆菌表型和分裂的作用, 结果显示: FtsZ-YFP 融合蛋白在对照组菌体中部呈规则的环状分布, 而经抗菌物质处理后, FtsZ-YFP 融合蛋白分散于菌体胞质中, 未形成 Z 环, 说明大肠杆菌的细胞分裂受到了抑制。Hossain 等^[56]利用免疫荧光法标记 FtsZ、DAPI 标记核酸, 经 CLSM 观察发现纳米颗粒 CdS 抑制了大肠杆菌正常的细胞分裂, 菌体经 CdS 处理后未能在拟核之间形成正常的隔膜, 而形成丝状细胞。

2.5 pH

细胞内 pH 对细胞生理代谢如蛋白质合成、物质跨膜运输、酶活性和细胞内代谢物质分泌等过程有重要影响。pH 的剧烈变化 (强酸、强碱) 影响酶活、扰乱代谢, 破坏细胞膜的选择性透过功能, 最终导致菌体的死亡。Bagar 等^[57]研究了胺碘酮对表达 pH 荧光探针 (RaVC) 的重组黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 胞内 pH 值的影响, 结果表明: 胺碘酮导致菌丝细胞内酸化, 且随着处理时间的延长, pH 值越来越低, 当处理时间为 60 min 时, 菌丝 pH 约为 6.0。

2.6 其他

FUN-1 是一种真菌代谢活性特异性荧光染料。该染料在具有代谢活性的细胞内可由黄绿色的胞内荧光转变为橘红色的空泡内荧光^[58], 其与 CLSM 联用可直观地分析抗菌物质对真菌代谢活性的影响。Sowa-Jasilek 等^[59]的研究结果表明大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 阴离子抗菌肽 (Anionic peptide 2, AP2) 与 Lysozyme 均可抑制白色念珠菌的代谢活性。Zdybicka-Barabas 等^[60]利用 FUN-1 染色, 经 CLSM 观察发现: 经大蜡螟抗菌肽 Apolipophorin III 处理后, 白色念珠菌的代谢活性显著高于对照组,

并且部分菌体由酵母相转为了菌丝相；尖孢镰刀菌(*Fusariumoxysporum*)菌丝体的代谢活性则低于对照组。Martinez 等^[61]分析了壳聚糖对新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)生物膜中菌体代谢活性的影响，FUN-1 标记结合 CLSM 的结果表明：经 1.25 g/L 壳聚糖处理 0.5 h 后，菌体代谢活性明显下降。

3 抗菌剂的作用位点分析

抗菌物质的作用位点包括细胞膜、核酸、细胞壁等^[62]，将抗菌物质用 FITC、罗丹明等荧光素标记或使用免疫荧光技术，再联合 CLSM，可直观、精确地分析抗菌物质的作用位点。

荧光素直接标记是 CLSM 分析抗菌剂作用位点最常用的方法。Sung 等^[63]用 FITC 标记多肽，经 CLSM 观察发现多肽结合于白色念珠菌的细胞膜。Imran 等^[37]运用荧光素钠 [5-(Aminoacetamido) fluorescein] 标记结合 CLSM 研究 Nisin Z 的作用位点，发现 Nisin Z 作用于李氏杆菌(*Listeria ivanovi*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)及无害李斯特菌(*Listeria innocua*)的菌体分裂处的隔膜。Lee 等^[64]比较了抗菌肽 HPA3NT3 与 HPA3NT3-A2 的抗菌作用位点，荧光探针四乙基罗丹明(Tetraethyl rhodamine, TAMRA)标记抗菌肽、CLSM 观察发现：HPA3NT3 作用于大肠杆菌细胞膜，HPA3NT3-A2 则渗入细胞内；凝胶阻滞实验(DNA/RNA gel retardation assay)和重组大肠杆菌中绿色荧光蛋白表达量的显著减少，说明 HPA3NT3-A2 作用于菌体的核酸。Sharma 等^[6]用羧基荧光素(Carboxyfluorescein)标记人类 β -防御素类似物 N2、N4 与 N5，膜特异性荧光染料 FM4-64 标记大肠杆菌的细胞膜，对 CLSM 图片中的荧光分布进行分析发现：沿着菌体宽度的方向，代表抗菌肽的绿色荧光强度先升后降、代表细胞膜的红色荧光强度则呈马鞍形变化，表明抗菌肽的作用位点不是在细胞膜，而在菌体内。Xu 等^[65]运用 CLSM 观察到 2-氨基吡啶酮(2-Aminoacridone)标记的壳寡糖分

布于辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)的萌发管和孢囊孢子，利用断层扫描技术进一步确定壳寡糖结合于细胞内部。

Jang 等^[66]研究发现 FITC 标记后的多肽 di-K19Hc 对白色念珠菌无抗菌作用，因此采用免疫荧光技术结合 CLSM 分析 di-K19Hc 的作用位点，结果显示抗菌肽结合于菌体表面，进一步的实验表明 di-K19Hc 既可与细胞壁组成之一的 β -1,3-葡聚糖结合，也破坏细胞膜的完整性。Morita 等^[67]也利用免疫荧光标记联合 CLSM 观察，确定核小体组成成分之一的核心组蛋白 H2B 结合于金黄色葡萄球菌细胞表面。Perkhofer 等^[68]采用免疫荧光标记 5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine)、Calcofluor white 标记黄曲霉(*Aspergillus flavus*)菌丝细胞壁，经 CLSM 观察发现 5-羟色胺分布于菌丝细胞质。

4 抗生物膜

生物膜(Biofilm, BF)是菌体黏附在物体表面上形成的一种具有高度结构性的膜状复合物，其主要成分是菌体及其分泌的多糖、蛋白及核酸等胞外基质。自然环境中，90%以上的微生物是以生物膜的形式存在。生物膜可使病原菌抵御宿主免疫系统和抗菌药物的杀伤作用，从而产生对抗菌药物的高度耐药性(可达到浮游状态的 10–1 000 倍)，导致感染难以清除^[69]。因此，分析生物膜形成与结构及其在抗菌过程中的变化对抗菌机理研究有着重要意义。

不同于扫描电子显微镜和原子力显微镜仅对生物膜表面形貌进行观察分析，CLSM 采用激光光源、共聚焦技术及点扫描技术，可对较厚的样品进行高分辨率的无损断层扫描，再使用软件对图像定量分析及三维重建等操作，能够对生物膜的整体进行全面的定量分析，因此，CLSM 在生物膜的研究中有极为广泛的应用。

4.1 生物膜中的菌体

4.1.1 菌体活性：抗菌作用研究中，生物膜中菌体活性的变化是判断药物抗生物膜效果的主要依据之一。根据死活细胞膜通透性的差异选用

SYTO9/PI, 或选用真菌代谢活性特异性荧光染料 FUN-1^[61,70], 对菌体细胞进行标记, 经 CLSM 直接地观察菌体活性变化, 还可结合图像分析软件进行定量地分析。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)生物膜中的菌体死活比例随二氧化铈纳米颗粒处理时间的延长而升高^[71]; 在材料表面加载的抗菌肽 CysN 和 Cys13 均提高了材料表面黏附菌体的死菌比例, 其中, 铜绿假单胞菌的 CysN 处理组和 Cys13 处理组的死菌比例分别为 40.6%和 30.1%, 金黄色葡萄球菌的 CysN 处理组和 Cys13 处理组的死菌比例分别为 13.0%和 9.8%^[72]; 天然牙菌斑生物膜中活菌比例随着 ZnCl_2 浓度的增加先下降后趋于平缓, 进一步比较生物膜内层、中间层及外层的菌体活性发现: 牙菌斑生物膜内层中活菌比例随着 ZnCl_2 浓度的增加无显著变化, 且与空白对照组差异不显著, 中间层和外层的活菌比例则随着 ZnCl_2 浓度的增加而下降^[73]。

4.1.2 菌间关系: 在由多种微生物组成的生物膜中, 不同菌种随时空变化存在菌种的交替演变过程。将荧光原位杂交技术(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)与 CLSM 联用, 可记录单个细胞的行为信号, 并直观地分析生物膜系统中不同微生物群体之间的关系。Guggenheim 等^[74]建立了烧伤创面的多种细菌生物膜模型, 通过 FISH 结合 CLSM 观察生物膜形成过程中各种菌在空间分布上的变化, 结果表明: 在 41.5 h 时由粪肠球菌、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)及金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌形成生物膜中以前 2 种菌居多, 而在加入革兰氏阴性菌铜绿假单胞菌和大肠杆菌培养 14 h 后, 革兰氏阴性菌成为优势菌群。Hammond 等^[75]研究了 3 种抗生素软膏对铜绿假单胞菌与金黄色葡萄球菌共培养形成的生物膜中菌体组成的影响, 将生物膜进行 FISH 后经 CLSM 观察发现: 庆大霉素软膏(Gentamicin ointment)使 2 种

菌均大大减少, 莫匹罗星软膏(Mupirocin ointment)仅减少生物膜中金黄色葡萄球菌数量、对铜绿假单胞菌数量无明显影响, 而三抗菌素软膏(Triple antibiotic ointment)则反之。

4.2 生物膜结构定量分析

菌体在生物膜形成过程及成熟后, 生物膜结构有其特异性。成熟的生物膜是由大量胞外聚合物包裹菌体的三维立体结构, 一般由多个蘑菇样或柱样等形状的亚单位组成。在评价抗菌药物的抗生物膜效果时, 生物膜结构的变化是考虑的重要因素之一。利用 SYTO9、吖啶橙(Acridine orange, AO)等核酸染料或使用 GFP 标记菌体, 经 CLSM 观察, 不仅可直接观地分析生物膜各层面及整体的结构, 进一步结合图像分析软件, 还可进行结构的定量分析, 获得生物膜厚度、生物量、基质覆盖率等相关信息。

COMSTAT 是目前分析 CLSM 图像最为常用的软件, 该软件是由丹麦技术大学微生物系的 Arne Heydorn 教授团队于 2000 年专门针对微生物被膜分析开发的。Yang 等^[76]利用 CLSM 结合 COMSTAT 微生物被膜分析软件分析了溴化呋喃酮类化合物对铜绿假单胞菌生物膜结构的影响, 结果表明: 5-BBF、6-BBF 和 7-BBF 三种化合物均能显著减少生物膜的生物量($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), 减少量分别为 71%、53%和 50%; 6-BBF 和 7-BBF 处理后的生物膜平均厚度(μm)分别下降至 60%、74%, 5-BBF 处理组无显著变化; 3 种化合物处理组间的基质覆盖率无显著差异, 均约为对照组的 60%。Gomes 等^[77]研究发现: 2.56 mg/L 的氟康唑(Fluconazole)可降低白色念珠菌生物膜的活性, 提高生物膜的生物量($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)、平均厚度; 相同浓度的氟康唑对光滑念珠菌(*Candida glabrata*)生物膜的活性与结构无显著影响。Dashper 等^[78]比较了酪蛋白糖肽(κ -Casein glycopeptide, KCG)、双氯苯双胍己烷(Chlorhexidine, CHX)与 ZnCl_2 对变异链球菌(*Streptococcus mutans*)生物膜结构的作用, 结果表

明: 2.4 g/L KCG 导致生物膜生物量和平均厚度分别下降 59%、69%, 与 0.1% CHX 与 20 mmol/L ZnCl₂ 的结果无显著差异; 3 种抗菌药物处理后的表面积与生物量比值($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)、粗糙系数均显著升高。

用于对 CLSM 图像进行生物膜结构分析的软件还有: Image structure analyzer (ISA)^[79]、Image J^[80-81]、BioImage L、PHLIP 等。余加林等的研究团队^[82-84]运用 ISA 对白色念珠菌、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)及铜绿假单胞菌等多种生物膜的结构进行定量分析, 其中, 区域孔径(AP)和平均扩散距离(ADD)反映 BF 结构发展过程中间隙孔道及营养物质供应距离的变化; 结构熵(TE)反映 BF 的不均一性。Unal 等^[85]运用分析软件 BioImage L 比较了流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)野生株和群体感应系统缺陷型菌株所形成的生物膜结构, 发现二者的基质覆盖率、生物量(μm^3)有显著的差异。Bridier 等^[86]利用 PHLIP 软件分析 CLSM 图片, 比较了 6 种条件致病菌在相同条件下形成生物膜的结构, 其中, 粪肠球菌生物膜的生物量(μm^3)最低, 铜绿假单胞菌生物膜厚度最高, 单核细胞增生利斯特菌和铜绿假单胞菌的粗糙度显著高于其他菌。

4.3 生物膜的形成

生物膜形成是一个较为复杂的过程, 一般来说要经历黏附、发展和成熟 3 个阶段。抗菌药物除了直接抑制菌体活性外, 还可通过减少菌体在基质表面的黏附、干扰群体感应系统、抑制胞外聚合物的分泌等阻碍生物膜形成, 破坏生物膜结构, 达到抗生物膜作用。

4.3.1 黏附: 生物膜的形成是以菌体在基质上的黏附为起点。黏附过程受到细胞表面的疏水性和静电力、各种黏附因子或附属结构, 以及基质的表面特性等因素的影响。Al-Ahmad 等^[87]运用 FISH 结合 CLSM 分析了口腔细菌在 6 种移植材料上的黏附情况, 结果表明: 6 种材料表面均黏附了内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、链球菌属(*Streptococcus*

spp.)、韦荣球菌属(*Veillonella* spp.)及具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*), 其中链球菌属(*Streptococcus* spp.)黏附的菌体量最多。Guegan 等^[88]利用 SYTO9 染色与 CLSM 分析发现: 基质表面弹性系数影响交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)和芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)在琼脂糖凝胶表面的黏附, 其中交替假单胞菌在较硬的琼脂浓度为 3% 的凝胶表面的覆盖率为 13.5%, 显著高于其在琼脂浓度为 0.5% 的凝胶表面的覆盖率(9.1%), 芽孢杆菌在弹性系数不同的 2 个凝胶表面的覆盖率无显著差异, 但菌体黏附形态有明显区别。

由于基质表面特性可影响菌体对基质的黏附作用, 因此可通过对基质表面进行修饰、改变基质表面特性, 减少菌体在基质表面的黏附, 达到抗生物膜的作用。Chen 等^[72]的 SYTO 9/PI 双染联合 CLSM 的研究结果表明, 在材料表面加载的抗菌肽 CysN、Cys13 均可降低菌体在材料表面的覆盖率, 其中, 铜绿假单胞菌的 CysN 处理组和 Cys13 处理组的覆盖率分别为 6.6% 和 7.1%, 显著低于空白组的 21.7%; 金黄色葡萄球菌的 CysN 处理组和 Cys13 处理组的覆盖率分别为 3.0% 和 6.3%, 仅为空白组的 17.3% 和 35.9%。Wang 等^[89]荧光探针 AO/EB 标记菌体, 经 CLSM 分析了不同的氮化钛镀膜对白色念珠菌在钛材料表面黏附情况的影响, 结果表明: 物理气相沉积技术(Physical vapour deposition, PVD)和等离子渗氮(Plasma nitriding)-物理气相沉积 2 种改性技术联用获得的材料表面的菌体黏附量明显少于纯钛(Flat Ti)和等离子渗氮改性技术得到的材料, 其中 2 种改性技术联用获得的材料表面黏附的部分菌体转为菌丝相, PVD 样品表面黏附菌体均为酵母相, 且死菌比例明显高于其他样品。

4.3.2 发展和成熟: 菌体黏附于基质表面后, 就进入生物膜的发展和成熟阶段, 即众多微菌落形成、进而连接成大的扩散性结构的过程。在此过程中, 多糖、蛋白质等胞外聚合物的生成及群体感应系统的调节是形成稳定、成熟生物膜的重要因素。

(1) 胞外多糖。在生物膜形成过程中, 菌体分泌的胞外多糖(Extracellular polysaccharides, EPS)使菌体黏结, 形成微菌落; 生物膜成熟后, EPS 作为生物膜的主要骨架结构, 将菌体包裹在其中, 形成生物膜菌的保护屏障, 对生物膜菌耐药起着重要的作用。因此分析生物膜胞外多糖的分泌、分布情况及抗菌药物对其影响, 在研究药物抗生物膜作用及机理中有着重要的意义。

研究生物膜胞外多糖的最为常见的方法则是使用结合了荧光素的凝集素, 如刀豆素 A (Concanavalina, ConA)、麦胚素 (Wheat germ agglutinin, WGA) 和双花扁豆凝集素 (*Dolichos biflorus* agglutinin, DBA) 等, 或直接用 Calcofluor White (CW) 进行荧光标记, 再联合 CLSM 观察。Di Poto 等^[90]用蛋白荧光染料 SYPRO Ruby 标记胞外蛋白、Oregon Green 488-WGA 标记胞外多糖, 经 CLSM 比较了金黄色葡萄球菌不同菌株间产胞外聚合物的差异。根据凝集素对糖基的专一性, WGA 与 N-乙酰糖胺结合, ConA 与 α -甘露糖、 α -葡萄糖专一地结合, Marshall 等^[91]选用 FITC-ConA 和 Alexa-fluor-488-WGA 结合 CLSM 分析鲑鱼立克次氏体 (*Piscirickettsia salmonis*) 生物膜的胞外多糖, 结果表明: 在营养缺乏的条件下, 鲑鱼立克次氏体形成的胞外多糖中 α -甘露糖或 α -葡萄糖的含量大大多于 N-乙酰糖胺; 在生物膜形成过程中, 培养 3 h 后即分泌富含 α -甘露糖或 α -葡萄糖的多糖, 且多糖量随着时间延长而增多。Guggenheim 等^[74]建立了烧伤创面的多种细菌生物膜模型, 并利用 YO-PRO 1 标记菌体、CW 标记胞外多糖, 结合 CLSM 观察生物膜中胞外多糖与菌体的分布。Dror-Ehre 等^[92]用 SYTO 9 和 PI 标记菌体、Alexa Fluor 647-ConA 标记胞外多糖, 经 CLSM 观察发现: 铜绿假单胞杆菌生物膜经高分子包覆的银纳米颗粒 (Molecularly capped silver nanoparticles, Ag-MCNPs) 处理后, 活菌比例明显下降, 包裹在菌体周围的多糖也大大减少。

Chau 等^[93]将荧光标记的葡聚糖与变异链球菌共培养, 在菌体糖基转移酶 (Glucosyltransferases, GTFs) 作用下形成荧光标记的胞外多糖, 再利用 SYTO9 标记菌体, 分析发现含氟涂料可减少变异链球菌生物膜中的菌体生物量及胞外多糖量。Martinez 等^[61]分析了壳聚糖对新型隐球酵母胞外多糖分泌情况的影响, 免疫荧光技术 (MAb 18B7-FITC-conjugated goat anti-mouse IgG1) 结合 CLSM 的结果表明: 培养 48 h 后的生物膜经 1.25 g/L 壳聚糖处理 0.5 h 后, 多糖量明显减少, 生物膜厚度下降。

(2) 群体感应。群体感应 (Quorum sensing, QS) 系统是一种细菌间信息传递机制, 通过合成和分泌自诱导信号分子的浓度来控制整个细菌群体的行为, 以保证细菌生物膜中营养物质的运输和废物的排出, 对生物膜的形成及其对药物的敏感性等有重要的影响。De Araujo 等^[94]构建了肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的 QS 系统自诱导分子 AI-2 相关基因 *lsrCD* 和 *tqsA* 的缺失突变株, 利用 GFP 标记联合 CLSM 比较突变株与野生株的生物膜形成情况, 发现: 野生株生物膜的最大厚度达到 160 μm 、基质覆盖率为 32.2%, 而 *lsrCD* 缺失突变株和 *tqsA* 缺失突变株生物膜的基质覆盖率为 86.3% 和 90%, 生物量虽大于野生株, 但生物膜结构不完整。变异链球菌的 QS 系统依赖于由 *comC* 编码的感受态刺激肽 (Competence stimulating peptide), Wang 等^[95]运用 SYTO 9/PI 双染联合 CLSM 比较了 *comC* 基因缺失突变株与野生株生物膜对洗必泰 (Chlorhexidine, CHX) 的敏感性, 结果表明: 突变株与野生株的生物膜厚度相近, 但生物膜结构有明显差异; 经 CHX 处理后, 突变株生物膜结构比野生株松散, 另外突变株生物膜中活死菌体比例下降了 67%, 远高于野生株的 39%。

干扰群体感应系统的物质可以影响生物膜形成、增加生物膜对药物的敏感性、降低细菌致病性等, 又鉴于病原菌耐药性等问题, 因此作用于群体感应系统的抗菌药物近年成为新型抗菌药物研究

的热点。Ho 等^[96]以表达 *lasB-gfp* 融合质粒的铜绿假单胞菌为对象, 结合 Hoechst 染色后经 CLSM 观察, 发现: 在经二氢吡咯酮类化合物处理后, 表达 GFP 的菌体比例显著下降, 说明 QS 系统控制基因 *lasB* 的转录受到抑制, 二氢吡咯酮类化合物干扰铜绿假单胞菌 QS 系统。

5 结语

激光共聚焦扫描显微镜以激光为光源, 采用共聚焦技术和点扫描技术, 使其分辨力较传统光学显微镜大为提高, 其具有的活细胞动态监测、断层扫描及三维图像重建等功能, 联合其他生物学技术, 可定性、定量、定位地检测组织细胞内的多种生化成分。然而, 在已发表的应用 CLSM 进行抗菌机理研究的文献中, CLSM 的功能还没有得到最大程度的发挥, CLSM 应用的范围还有待进一步扩展。如: 荧光探针标记抗菌剂联合 CLSM 观察是抗菌剂作用位点分析的重要方法, 在多肽类抗菌剂的相关研究中有广泛应用, 而非多肽类抗菌剂由于荧光探针标记的问题较少使用此方法; 真菌细胞膜结构的变化可通过荧光探针标记、CLSM 观察抗菌作用引起的细胞膜 PS 的表面化, 而细菌细胞膜结构的变化则多是通过研究抗菌剂对合成的脂膜、脂质体等模拟细胞膜的影响来间接反映; 在已发表的运用 CLSM 进行抗生物膜研究的文献中, 约一半仅仅是进行简单的菌体总量及死活菌体数量的定性观察, 其余文献中运用图像分析软件定量分析生物膜结构, 但评价生物膜结构的参数有较大差异, 有待统一。未来, 随着荧光探针、其他生物学技术及图像分析软件的发展完善, CLSM 在抗菌机理研究中的应用将更为广泛、高效。

参考文献

- [1] Kong M, Chen XG, Xing K, et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1): 51-63
- [2] Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes[J]. Progress in Lipid Research, 2012, 51(2): 149-177
- [3] Schmidt NW, Wong GC. Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: geometry, coordination chemistry, and molecular engineering[J]. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2013, 17(4): 151-163
- [4] Wu QP, Wei MK, Wu JL, et al. Advance in action mode of chemical disinfectants[J]. Microbiology China, 2006, 33(6): 117-121 (in Chinese). 吴清平, 韦明肯, 吴军林, 等. 化学消毒剂作用机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 117-121
- [5] Gill AO, Holley RA. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(1): 1-9
- [6] Sharma H, Nagaraj R. Antimicrobial activity of human beta-defensin 4 analogs: insights into the role of disulfide linkages in modulating activity[J]. Peptides, 2012, 38(2): 255-265
- [7] Chen YX, Zeng H, Tian J, et al. Dill (*Anethum graveolens* L.) seed essential oil induces *Candida albicans* apoptosis in a metacaspase-dependent manner[J]. Fungal Biology, 2014, 118(4): 394-401
- [8] Kang K, Wong KS, Fong WP, et al. Metergoline-induced cell death in *Candida krusei*[J]. Fungal Biology, 2011, 115(3): 302-309
- [9] Park SC, Kim JY, Jeong C, et al. A plausible mode of action of pseudin-2, an antimicrobial peptide from *Pseudis paradoxa*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1808(1): 171-182
- [10] Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, et al. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers[J]. Nano Letters, 2008, 8(2): 420-424
- [11] Yu L, Guo L, Ding JL, et al. Interaction of an artificial antimicrobial peptide with lipid membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1788(2): 333-344
- [12] Torrent M, Sanchez D, Buzon V, et al. Comparison of the membrane interaction mechanism of two antimicrobial RNases: RNase 3/ECP and RNase 7[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1788(5): 1116-1125
- [13] Dubreil L, Vié V, Beauvais S, et al. Aggregation of puromycin in phospholipid monolayers spread at the air-liquid interface[J]. Biophysical Journal, 2003, 85(4): 2650-2660
- [14] Maurya IK, Thota CK, Sharma J, et al. Mechanism of action of novel synthetic dodecapeptides against *Candida albicans*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1830(11): 5193-5203
- [15] Jiang Y, Leung AW, Wang X, et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by photodynamic action of hypocrellin B[J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2013, 10(4): 600-606
- [16] Park J, Kim J, Singha K, et al. Nitric oxide integrated polyethylenimine-based tri-block copolymer for efficient antibacterial activity[J]. Biomaterials, 2013, 34(34): 8766-8775
- [17] Zhao J, Wang Z, Dai Y, et al. Mitigation of CuO nanoparticle-induced bacterial membrane damage by dissolved organic matter[J]. Water Research, 2013, 47(12): 4169-4178
- [18] Lai L, Lin C, Xiao CQ, et al. Adhesion of quantum dots-induced membrane damage of *Escherichia coli*[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2013, 389(1): 61-70
- [19] Cui X, Li CM, Bao H, et al. *In situ* fabrication of silver nanoarrays in hyaluronan/PDDA layer-by-layer assembled structure[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2008, 327(2): 459-465
- [20] Wang Y, Ke XY, Khara JS, et al. Synthetic modifications of the immunomodulating peptide thymopentin to confer

- anti-mycobacterial activity[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9): 3102-3109
- [21] Yoneyama F, Imura Y, Ohno K, et al. Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lactacin Q[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(8): 3211-3217
- [22] Imura Y, Choda N, Matsuzaki K. Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 95(12): 5757-5765
- [23] Lee JK, Park SC, Hahn KS, et al. A helix-PXXP-helix peptide with antibacterial activity without cytotoxicity against MDRPA-infected mice[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(3): 1025-1039
- [24] Li L, Zhang C, Xu D, et al. Expression of recombinant EARL11, a hybrid proline-rich protein of Arabidopsis, in *Escherichia coli* and its inhibition effect to the growth of fungal pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 2012, 506(1): 50-61
- [25] Wong JH, Ng TB, Legowska A, et al. Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans*[J]. *Peptides*, 2011, 32(10): 1996-2002
- [26] Zhang YQ, Wu QP, Zhang JM, et al. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(4): 1006-1015
- [27] Li WR, Xie XB, Shi QS, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 1115-1122
- [28] Chakraborty SP, Sahu SK, Pramanik P, et al. *In vitro* antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 436(1/2): 659-676
- [29] Sanpui P, Murugadoss A, Prasad PV, et al. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 124(2): 142-146
- [30] Fang F, Fang X, Li J, et al. A detailed approach to study the antibacterial mechanisms of nanostructure[J]. *Applied Surface Science*, 2012, 258(10): 4397-4401
- [31] Zhang XY, Wu QP, Zhang JM, et al. Study on mechanism of effect of chlorine dioxide on *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2007, 24(1): 16-20 (in Chinese).
张晓煜, 吴清平, 张菊梅, 等. 二氧化氯对大肠杆菌作用机理的研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2007, 24(1): 16-20
- [32] Palma-Guerrero J, Huang IC, Jansson HB, et al. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(8): 585-594
- [33] Ma HL, Xu SS, He RH, et al. Study on Ca^{2+} transmembrane behaviors of magnetic-treated *S. aureus* with Fura-2/AM fluorescece probe and LCSM[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2012, 32(2): 407-410 (in Chinese)
马海龙, 许审时, 何荣海, 等. 利用 Fura-2/AM 荧光探针法和 LCM 法研究受磁场处理 *S. aureus* 细胞 Ca^{2+} 的跨膜行为[J]. *光谱学与光谱分析*, 2012, 32(2): 407-410
- [34] Ma SL, Dong X, Xia X, et al. Impact of *Streptococcus sanguis* bacteriocins on the growth curve and intracellular free calcium concentration of *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Journal of Oral Science Research*, 2014, 30(2): 108-111 (in Chinese)
马晟利, 董雪, 夏雪, 等. 血链球菌细菌素对牙龈卟啉单胞菌生长曲线及细胞内钙离子浓度的影响[J]. *口腔医学研究*, 2014, 30(2): 108-111
- [35] Cho J, Choi H, Lee J, et al. The antifungal activity and membrane-disruptive action of dioscin extracted from *Dioscorea nipponica*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1828(3): 1153-1158
- [36] Haney EF, Petersen AP, Lau CK, et al. Mechanism of action of puroindoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1828(8): 1802-1813
- [37] Imran M, Revol-Junelles AM, de Bruin M, et al. Fluorescent labeling of nisin Z and assessment of anti-listerial action[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 95(2): 107-113
- [38] Strathmann M, Wingender J. Use of an oxonol dye in combination with confocal laser scanning microscopy to monitor damage to *Staphylococcus aureus* cells during colonisation of silver-coated vascular grafts[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(3): 234-240
- [39] Chang WQ, Wu XZ, Cheng AX, et al. Retigeric acid B exerts antifungal effect through enhanced reactive oxygen species and decreased cAMP[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1810(5): 569-576
- [40] Ferreira S, Silva F, Queiroz JA, et al. Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 180: 62-68
- [41] Mezule L, Tsyfansky S, Yakushevich V, et al. A simple technique for water disinfection with hydrodynamic cavitation: effect on survival of *Escherichia coli*[J]. *Desalination*, 2009, 248(1/3): 152-159
- [42] Lee J, Hwang JS, Hwang IS, et al. Coprisin-induced antifungal effects in *Candida albicans* correlate with apoptotic mechanisms[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 52(11/12): 2302-2311
- [43] Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria[J]. *International Endodontic Journal*, 2010, 36(1): 70-77
- [44] Shi X, Li B, Qin G, et al. Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 67: 138-143
- [45] Troppens DM, Chu M, Holcombe LJ, et al. The bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function and affects calcium homeostasis in *Neurospora crassa*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 56: 135-146
- [46] Ramani M, Ponnusamy S, Muthamizhchelvan C, et al. Amino acid-mediated synthesis of zinc oxide nanostructures and evaluation of their facet-dependent antimicrobial activity[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 117: 233-239
- [47] Luo Z, Wu Q, Zhang M, et al. Cooperative antimicrobial activity of CdTe quantum dots with rocephin and fluorescence monitoring for *Escherichia coli*[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 362(1): 100-106
- [48] Wi HS, Na EY, Yun SJ, et al. The antifungal effect of light emitting diode on *Malassezia* yeasts[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2012, 67(1): 3-8
- [49] Li Y, Xiang Q, Zhang Q, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application[J]. *Peptides*, 2012, 37(2): 207-215
- [50] Thibane VS, Ells R, Hugo A, et al. Polyunsaturated fatty acids

- cause apoptosis in *C. albicans* and *C. dubliniensis* biofilms[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1820(10): 1463-1468
- [51] Kumar A, Pandey AK, Singh SS, et al. Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2011, 51(10): 1872-1881
- [52] Ibrahim M, Wang F, Lou MM, et al. Copper as an antibacterial agent for human pathogenic multidrug resistant *Burkholderia cepacia* complex bacteria[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(6): 570-576
- [53] Tamboli DP, Lee DS. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 260: 878-884
- [54] Sass P, Brötz-Oesterhelt H. Bacterial cell division as a target for new antibiotics[J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(5): 522-530
- [55] Keffer JL, Huecas S, Hammill JT, et al. Chrysopaentins are competitive inhibitors of FtsZ and inhibit Z-ring formation in live bacteria[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, 21(18): 5673-5678
- [56] Hossain ST, Mukherjee SK. Toxicity of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles against *Escherichia coli* and HeLa cells[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 260: 1073-1082
- [57] Bagar T, Bencina M. Antiarrhythmic drug amiodarone displays antifungal activity, induces irregular calcium response and intracellular acidification of *Aspergillus niger*—amiodarone targets calcium and pH homeostasis of *A. niger*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(10): 779-791
- [58] Millard PJ, Roth BL, Thi HPT, et al. Development of the fun-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2897-2905
- [59] Sowa-Jasilek A, Zdybicka-Barabas A, Staczek S, et al. Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme[J]. Peptides, 2014, 53: 194-201
- [60] Zdybicka-Barabas A, Staczek S, Mak P, et al. The effect of *Galleria mellonella* apolipoprotein III on yeasts and filamentous fungi[J]. Journal of Insect Physiology, 2012, 58(1): 164-177
- [61] Martinez LR, Mihi MR, Han G, et al. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms[J]. Biomaterials, 2010, 31(4): 669-679
- [62] Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(3): 491-511
- [63] Sung WS, Park SH, Lee DG. Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of Urechistachykinins, neuropeptides derived from *Urechis unicinctus*[J]. FEBS Letters, 2008, 582(16): 2463-2466
- [64] Lee JK, Park SC, Hahn KS, et al. Antimicrobial HPA3NT3 peptide analogs: placement of aromatic rings and positive charges are key determinants for cell selectivity and mechanism of action[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1828(2): 443-454
- [65] Xu J, Zhao X, Wang X, et al. Oligochitosan inhibits *Phytophthora capsici* by penetrating the cell membrane and putative binding to intracellular targets[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 88(2): 167-175
- [66] Jang WS, Kim HK, Lee KY, et al. Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*[J]. FEBS Letters, 2006, 580(5): 1490-1496
- [67] Morita S, Tagai C, Shiraishi T, et al. Differential mode of antimicrobial actions of arginine-rich and lysine-rich histones against Gram-positive *Staphylococcus aureus*[J]. Peptides, 2013, 48: 75-82
- [68] Perkhof S, Niederegger H, Blum G, et al. Interaction of 5-hydroxytryptamine (serotonin) against *Aspergillus* spp. *in vitro*[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, 29(4): 424-429
- [69] van Acker H, van Dijk P, Coenye T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms[J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(6): 326-333
- [70] Sanchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, et al. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species[J]. Archives of Oral Biology, 2013, 58(10): 1318-1326
- [71] Jing H, Mezgebe B, Aly Hassan A, et al. Experimental and modeling studies of sorption of ceria nanoparticle on microbial biofilms[J]. Bioresource Technology, 2014, 161: 109-117
- [72] Chen R, Wilcox MD, Cole N, et al. Characterization of chemoselective surface attachment of the cationic peptide melimine and its effects on antimicrobial activity[J]. Acta Biomaterialia, 2012, 8(12): 4371-4379
- [73] Gu H, Fan D, Gao J, et al. Effect of ZnCl₂ on plaque growth and biofilm vitality[J]. Archives of Oral Biology, 2012, 57(4): 369-375
- [74] Guggenheim M, Thurnheer T, Gmur R, et al. Validation of the Zürich burn-biofilm model[J]. Burns, 2011, 37(7): 1125-1133
- [75] Hammond AA, Miller KG, Kruczek CJ, et al. An *in vitro* biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates[J]. Burns, 2011, 37(2): 312-321
- [76] Yang S, Abdel-Razek OA, Cheng F, et al. Bicyclic brominated furanones: a new class of quorum sensing modulators that inhibit bacterial biofilm formation[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014, 22(4): 1313-1317
- [77] Gomes PN, da Silva WJ, Pousa CC, et al. Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole[J]. Archives of Oral Biology, 2011, 56(11): 1274-1281
- [78] Dashper SG, Liu SW, Walsh KA, et al. *Streptococcus mutans* biofilm disruption by kappa-casein glycopeptide[J]. Journal of Dentistry, 2013, 41(6): 521-527
- [79] Fabrega J, Zhang R, Renshaw JC, et al. Impact of silver nanoparticles on natural marine biofilm bacteria[J]. Chemosphere, 2011, 85(6): 961-966
- [80] Villena GK, Fujikawa T, Tsuyumu S, et al. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(6): 1920-1926
- [81] Ihnen AC, Lee JH, Lee WY. Effects of disordered hemispherical micropatterns on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 75(2): 601-607
- [82] Lu Q, Yu JL, Yang XQ, et al. Ambroxol interferes with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, 36(3): 211-215
- [83] Gao XN, Yu JL, Lu Q, et al. Observation and quantitative analysis of the formation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by using tetrazolium salt reduction assay and confocal laser

- scanning microscopy[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(12): 1081-1084, 1088 (in Chinese)
- 郜向娜, 余加林, 芦起, 等. 四唑盐减低法结合激光共聚焦显微镜定量分析表皮葡萄球菌生物被膜体外模型[J]. 中国微生物生态学杂志, 2010, 22(12): 1081-1084, 1088
- [84] Zheng L, Yu JL, Lu Q, et al. Establishment of the model of *Candida albicans* biofilm *in vitro* and the comparison of different detections[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(5): 406-410 (in Chinese)
- 郑璐, 余加林, 芦起, 等. 白色念珠菌生物膜体外模型的建立及不同检测方法比较[J]. 中国微生物生态学杂志, 2010, 22(5): 406-410
- [85] Unal CM, Singh B, Fleury C, et al. QseC controls biofilm formation of non-typeable *Haemophilus influenzae* in addition to an AI-2-dependent mechanism[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2012, 302(6): 261-269
- [86] Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, et al. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 82(1): 64-70
- [87] Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, et al. *In vivo* study of the initial bacterial adhesion on different implant materials[J]. Archives of Oral Biology, 2013, 58(9): 1139-1147
- [88] Guegan C, Garderes J, Le Pennec G, et al. Alteration of bacterial adhesion induced by the substrate stiffness[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 114: 193-200
- [89] Wang J, An Y, Liang H, et al. The effect of different titanium nitride coatings on the adhesion of *Candida albicans* to titanium[J]. Archives of Oral Biology, 2013, 58(10): 1293-1301
- [90] Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, et al. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action on host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. Biomaterials, 2009, 30(18): 3158-3166
- [91] Marshall SH, Gomez FA, Ramirez R, et al. Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth stress conditions: a putative *in vivo* survival/persistence strategy in marine environments[J]. Research in Microbiology, 2012, 163(8): 557-566
- [92] Dror-Ehre A, Adin A, Markovich G, et al. Control of biofilm formation in water using molecularly capped silver nanoparticles[J]. Water Research, 2010, 44(8): 2601-2609
- [93] Chau NPT, Pandit S, Jung JE, et al. Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity[J]. Journal of Dentistry, 2014, 42(6): 726-734
- [94] De Araujo C, Balestrino D, Roth L, et al. Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(7): 595-603
- [95] Wang WL, Liu J, Huo YB, et al. Bacteriocin immunity proteins play a role in quorum-sensing system regulated antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* UA159[J]. Archives of Oral Biology, 2013, 58(4): 384-390
- [96] Ho KK, Chen R, Willcox MD, et al. Quorum sensing inhibitory activities of surface immobilized antibacterial dihydropyrrones *via* click chemistry[J]. Biomaterials, 2014, 35(7): 2336-2345

编辑部公告

撤销发表申明

本刊收到作者李维国的来函(2015-06-08 10:04), 认为其在《微生物学通报》2009 年第 4 期 610-615 页发表的“嗜盐菌对高盐有机废水处理的强化作用”一文存在瑕疵, 请求撤回该文。编辑部同意其撤销发表该文的申请, 特此通告, 请所有读者勿再引用此文。

《微生物学通报》编辑部
2015-06-09