

# 鲍曼不动杆菌生物膜形成的调节

## Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation

杨长亮(YANG Chang-liang) 综述 黄前川(HUANG Qian-chuan) 审校

(广州军区武汉总医院,湖北 武汉 430070)

(Wuhan General Hospital of Guangzhou Military, Wuhan 430070, China)

**[关键词]** 鲍曼不动杆菌;生物膜;群体感应信号;表面黏附蛋白;二价阳离子;细菌Ⅳ型分泌系统;BfmRS 系统;抗药性;微生物

**[中图分类号]** R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)03-0228-04

鲍曼不动杆菌广泛分布于自然界和医院环境中,能在潮湿和干燥的表面生存,也可存在于健康人的皮肤和上呼吸道,为条件致病菌。但近年来鲍曼不动杆菌已成为医院感染的重要病原菌,在非发酵菌中,其临床标本分离率仅次于铜绿假单胞菌<sup>[1]</sup>。由于高度的多重耐药性或泛耐药性,鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药性日益升高,已经导致了世界范围内的暴发流行<sup>[2-4]</sup>。鲍曼不动杆菌的生物膜感染是其致病性的重要方式,因此阐明鲍曼不动杆菌的生物膜形成机制将为防治其所致的感染提供有效的方法。

### 1 生物膜的结构和功能

生物膜是一种与(生物或非生物)表面相关的多细胞群体,细胞接触后排列成三维结构,包裹在碳水化合物、核酸、蛋白质和其他大分子组成的细胞外基质中,是细菌适应外界环境的重要方式。细菌生物膜不仅对抗菌药物耐受性远高于浮游细胞,而且利于细菌在干燥、营养不足等不利环境的生存,生物膜已经成为细菌的重要毒力因子<sup>[5]</sup>。鲍曼不动杆菌是最常见的与医疗设备相关的医院感染菌。临床标本分离株证明,鲍曼不动杆菌菌株具有黏附留置导管、人工关节、冠脉支架等表面<sup>[6]</sup>和呼吸系统上皮细胞的能力,特别是从导管相关的尿路感染或血流感染中分离的临床菌株,都具备形成生物膜和抗菌药物耐药性的特征<sup>[7-8]</sup>,已经成为导致持续感染和死亡的重要原因。

### 2 鲍曼不动杆菌生物膜形成的调节

细菌生物膜的启动和发展,并不只是一个细菌细胞偶然的表面黏附。相反,它是一个高度调控的一系列分子事件,包括连续的 5 个步骤:(1)单个细胞的可逆黏附;(2)细胞外基质介导的不可逆黏附;(3)生物膜早期形成结构;(4)成熟的生物膜结构;(5)生物膜内细胞的释放等过程。最常见影响生物膜形成的因素有:群体感应、外膜蛋白 Bap、大分子分泌物(细胞外基质、核酸等)、营养供应(碳源、蛋白质、阳离子等)、细菌附属物(纤毛和鞭毛)等;此外,外界环境刺激信号是通过 BfmRS 调控系统和/或转录调控影响生物膜形成的相关基因表达。

**2.1 群体感应系统** 群体感应系统(quorum sensing, QS)是细菌监控自身群体密度的信号感受系统。细菌在繁殖过程中分泌一些特定的自诱导信号分子,当信号分子达到一定的阈值时,细菌感受到自身的细胞密度,从而启动某些致病基因的表达,这一过程称为群体感应。鲍曼不动杆菌含有合成自诱导分子乙酰高丝氨酸内酯(acyl-homoserine lactones, AHLs)的合成酶,可通过正反馈方式产生 AHLs<sup>[9]</sup>。这种分子主要在生物膜形成的中、后期起作用。鲍曼不动杆菌细胞从浮游状态向生物膜转化过程中,群体感应贯穿着生物膜合成的全过程,控制着细菌的代谢、蛋白合成和毒力的产生;当 AHL 分子达到阈值,细菌密度感应系统被激活,细菌不断分泌大量胞外基质(exopolysaccharide, EPS),EPS 黏结单个

[收稿日期] 2011-08-27

[作者简介] 杨长亮(1969-),男(汉族),江苏省扬州市人,副主任医师,主要从事临床听力学研究。

[通讯作者] 黄前川 E-mail:hqcwuhan@126.com

细菌而形成生物膜,阻碍抗菌药物的渗透作用,产生耐药性;呈高密度状态的细菌在感应系统的调控下细菌毒力骤然增强,同时抑制宿主的免疫系统。体外实验还发现当细菌的密度降低时,AHLs 分泌减少可导致生物膜迅速减少,补充外源 AHLs 可以恢复生物膜的成熟,可见,细胞密度传递信息是鲍曼不动杆菌生物膜成熟不可或缺的条件<sup>[10]</sup>;AHLs 作为群体感应信号,除了调控生物膜的分化外,还与细菌毒性因子的产生、抗菌药物的合成或降解、质粒结合转移等多种生物功能相关,并可以直接影响宿主细胞的基因表达<sup>[11]</sup>,是导致持续或反复感染的重要分子。

**2.2 表面黏附蛋白 (biofilm-associated protein, Bap)** Bap 家族是首先从金黄色葡萄球菌鉴定出的一类表面大分子蛋白质,参与生物膜起始阶段的黏附和促进生物膜的成熟。已经发现 Bap 存在于多种致病菌中,不同细菌的 Bap 在生物膜形成的作用不同。从临床血流感染的鲍曼不动杆菌分离株鉴定出的 Bap 与金黄色葡萄球菌具有同源性,核苷酸序列与细菌细胞表面黏附分子相一致。研究<sup>[12-13]</sup>发现突变的 Bap 会导致鲍曼不动杆菌在玻璃表面已经成熟的生物膜不稳定,在共聚焦成像激光扫描显微镜下表现为生物膜体积和厚度同时下降;目前认为 Bap 的功能是维持成熟生物膜的结构,推测可能的机制为 Bap 与邻近细胞的表面受体直接结合,或者与细胞外生物膜基质成分结合,从而维持细胞间黏附的稳定性;此外,鲍曼不动杆菌 Bap 的等电点为 2.90,是细菌细胞膜外酸性最强的蛋白质之一,可对多种抗菌药物的理化性质具有影响,从而产生耐药性。然而,目前为止,对于外界因素是否控制 Bap 的表达尚不清楚。

**2.3 二价阳离子浓度** 金属(尤其是铁)离子在细菌基因的表达中具有调控作用,其中一些金属离子在病原微生物的毒力中起着重要作用。已经证实铁、钙、镁、锰、铜等多种二价阳离子影响着鲍曼不动杆菌生物膜的形成。观察发现在 19606 型鲍曼不动杆菌的培养基中添加铁螯合剂降低铁离子水平,可导致培养皿表面形成的生物膜显著增多<sup>[14]</sup>;同样对于金黄色葡萄球菌、副球菌等多种细菌也存在低铁促进生物膜的合成,高铁却抑制的现象<sup>[15]</sup>。有研究证实蛋白 Emp 在低铁状态下生物膜的形成中起重要作用。值得注意的是 Emp 的表达依赖 Fur (ferric uptake regulator) 蛋白的调控,而这却与 Fur 蛋白调控基因表达需要高水平铁激活不一致<sup>[16]</sup>。相反,

高浓度的钙离子对生物膜的合成起促进作用。对临床多耐药鲍曼不动杆菌分离株的研究<sup>[8]</sup>表明,金属螯合剂 EDTA 结合钙离子后,低水平的游离钙使细菌在人体呼吸道上皮细胞或塑料表面的黏附及生物膜的形成能力显著降低。有报道<sup>[17-18]</sup>,铜绿假单胞菌在富含钙离子培养基中的生物膜厚度是不含钙离子培养基的 10 倍。目前认为高浓度的钙离子可以稳定和促进细胞外基质的表达,增加生物膜结构的聚集性和抑制生物膜的分解功能;此外,高钙离子还可以促进毒力因子藻酸盐的表达。二价阳离子对鲍曼不动杆菌生物膜影响的分子机制尚不完全明确,特别是缺铁的情况下,Fur 阻遏蛋白如何调控对 *Emp* 基因的表达还需要进一步研究。

#### 2.4 CsuA/BABCDE 基因簇 - 细菌 IV 型分泌系统

菌毛在鲍曼不动杆菌 19606 型菌株形成生物膜的过程中至关重要,这些菌毛的合成包括亚单位合成和组装两个步骤,受基因簇 CsuA/BABCDE 的调控<sup>[19]</sup>。其中基因 *CsuE* 编码菌毛蛋白亚单位,鲍曼不动杆菌 *CsuE* 突变株的菌毛合成及生物膜的形成显著下降,导入含有基因 *CsuE* 的重组质粒后则菌毛合成及生物膜的形成能力重新恢复<sup>[20]</sup>;而菌毛的的组装分泌过程则依赖 *CsuC* 基因表达的分子伴侣引导合成系统(chaperone-usher pili assembly system),其中 chaperone 蛋白的功能是结合和稳定菌毛亚单位,防止亚单位的水解,usher 蛋白则可以在细菌外膜形成孔道,与 chaperone 蛋白协同组装和分泌菌毛。由 CsuA / BABCDE 簇合成的菌毛在生物膜结构完全形成之前的起始阶段发挥作用,细胞通过菌毛黏附到非生物表面并启动微菌落形成阶段<sup>[13]</sup>。然而最近有报道<sup>[21]</sup>,19606 型菌株细胞存在长(260 nm;143~1 008 nm)、短(29 nm;5~140 nm)两种菌毛,在非生物表面黏附时需要同时存在两种菌毛,而 *CsuE* 基因突变株仅表达短菌毛,但黏附到上皮细胞的能力却显著高于 19606 型野生株。由此可见,鲍曼不动杆菌黏附到人体上皮细胞和非生物表面的机制并不完全相同。虽然黏附到支气管上皮细胞的机制仍不清楚,但是发现鲍曼不动杆菌广谱的  $\beta$ -内酰胺酶基因 *bla*PER-1 的表达和其细胞黏附水平及生物膜的形成能力呈正相关。这种相关性是鲍曼不动杆菌可以持续存在于医疗环境、人类宿主、甚至在广泛使用抗菌药物时的重要机制。

**2.5 BfmR-BfmRS 调控系统** BfmR-BfmRS 系统包括 *bfmR* 编码的应答调节因子和 *bfmS* 编码的感受器激酶。*bfmR* 基因位于 *bfmS* 基因的下游,当

信号刺激分子激活 *bfmS* 后,磷酸化的 BfmR 对 *csuA* /BABCDE 基因簇的表达进行调控,继而影响菌毛的合成和生物膜的形成。研究<sup>[19]</sup>发现,抑制 *bfmR* 的活性, *Csu* 基因在转录和翻译的水平下降,最终导致培养基中细菌菌毛和生物膜的合成停止;然而,抑制 BfmS 感受器激酶的活性,只能使生物膜的形成能力下降而不是终止。这表明 BfmS 感受器激酶并非细菌生物膜合成的必需成分, BfmR 可能还与其他感受器激酶存在相互作用。Stanley 等<sup>[22]</sup>认为细菌细胞可以感受多种外界信号,影响 BfmRS 系统调控生物膜的形成,这个调控系统并非只限于生物膜合成的启动,同时还影响着细胞形态的变化。

**2.6 温度与培养基** 培养基中碳源的形式、无机盐的含量等因素对生物膜的形成都会造成显著影响。例如鲍曼不动杆菌 BfmR 突变株 Bfm17 在 LB 肉汤培养基中不能形成黏附或生物膜,然而采用 Tris-M9 基础培养基,细胞则可以在培养皿周边形成生物膜;而野生株 19606 型鲍曼不动杆菌在 Tris-M9 基础培养基产生的生物膜和细胞密度却低于 LB 肉汤培养基。同样,温度对生物膜的形成也会产生影响,鲍曼不动杆菌 19606 型在 30℃ 培养基中产生的生物膜量就显著高于 37℃ 时。总之,这些现象体现了细胞外信号对生物膜发生、发展的重要性。

### 3 结论和展望

鲍曼不动杆菌形成生物膜的能力受多方面因素影响,是一种复杂而有序的形成过程:鲍曼不动杆菌浮游细胞在内、外信号的刺激下,通过激活 BfmRS 系统促进 *CsuA* /BABCDE 基因簇的表达而合成分泌细菌菌毛,随着黏附于生物/非生物表面细胞的逐步增多,在群体感应系统的作用下,细胞以正相反馈的方式分泌 AHLs 分子,继而产生大量的 EPS,在 EPS 中,细胞通过 Bap 分子之间彼此相连或 Bap 分子与基质中的多糖分子相连,形成微菌落,不断增厚的微菌落最终形成成熟的生物膜。随着对鲍曼不动杆菌生物膜形成过程的认识逐步深入,利用阻断形成环节达到防治的目的在实验室和临床已经取得了显著进展,尤其是利用金属螯合剂枸橼酸钠降低钙、镁离子,防治留置导管生物膜的形成,在临床已经取得很好的疗效<sup>[21]</sup>。尽管如此,鲍曼不动杆菌在医疗设备和人类宿主细胞表面的许多分子机制仍然不完全清楚,例如在细菌非生物表面和人肺泡上皮细胞

的黏附机制就不相同<sup>[23]</sup>。目前鲍曼不动杆菌的生物学信息已经进入基因组和后基因组时代,其中某些鲍曼不动杆菌菌株的基因组已经完成或接近完成全部的测序及相关的功能检测。因此,今后可以通过比较基因组学对鲍曼不动杆菌野生菌株和临床分离株进行研究,在基因水平、蛋白水平探讨耐药性基因片段和生物膜形成的机制,为抑制生物膜的产生和抗菌治疗提供有效的靶点。

### [参考文献]

- [1] 王昌明,王晨,俞莲花,等. 鲍曼不动杆菌致呼吸机相关性肺炎的临床分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(5): 729 - 730.
- [2] Dijkshoorn L, Nmec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(12): 939 - 951.
- [3] Perez F, Hujer A M, Hujer K M, et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471 - 3484.
- [4] Hoffmann M S, Eber M R, Laxminarayan R. Increasing resistance of *Acinetobacter* species to imipenem in United States hospitals, 1999 - 2006 [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010, 131(2): 196 - 197.
- [5] Landini P, Antoniani D, Burgess J G, et al. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(3): 813 - 823.
- [6] 刘卫娟,左泽兰,马荣华. 机械通气患儿气管导管表面细菌生物膜形成及病原分析[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(9): 788 - 791.
- [7] Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications [J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(30): 276 - 278.
- [8] Lee H W, Koh Y M, Kim J, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces [J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(1): 49 - 54.
- [9] Niu C, Clemmer K M, Bonomo R A, et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii* [J]. J Bacteriol, 2008, 190(9): 3386 - 3392.
- [10] Dickschat J S. Quorum sensing and microbial biofilms [J]. Nat Prod Rep, 2010, 27(3): 343 - 369.
- [11] Rumbaugh K P. Convergence of hormones and autoinducers at the host/ pathogen interface [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(2): 425 - 435.
- [12] Rahbar M R, Rasooli I, Mousavi Gargari S L, et al. In silico analysis of antibody triggering biofilm associated protein in *Acinetobacter baumannii* [J]. J Theor Biol, 2010, 266(2): 275 - 290.

- J Epidemiol, 1988, 127(6):1289-1294.
- [9] Dumford D M 3rd, Nerandzic M M, Eckstein B C, *et al.* What is on that keyboard? Detecting hidden environmental reservoirs of *Clostridium difficile* during an outbreak associated with North American pulsed-field gel electrophoresis type 1 strains [J]. Am J Infect Control. 2009, 37(7): 15-19.
- [10] Mayfield J L, Leet T, Miller J, *et al.* Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile* [J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(4): 995-1000.
- [11] Aygün G, Demirkiran O, Utku T, *et al.* Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit [J]. J Hosp Infect, 2002, 52(4): 259-262.
- [12] Markogiannakis A, Fildisis G, Tsiplakou S, *et al.* Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008, 29(5): 410-417.
- [13] Barker J, Vipond I B, Bloomfield S F. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces [J]. J Hosp Infect, 2004, 58(1): 42-49.
- [14] Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review [J]. BMC Infect Dis, 2006, 6:130.
- [15] Hayden M K, Bonten M J, Blom D W, *et al.* Reduction in acquisition of vancomycin-resistant *enterococcus* after enforcement of routine environmental cleaning measures [J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(11):1552-1560.
- [16] Carling P C, Parry M M, Rupp M E, *et al.* Improving cleaning of the environment surrounding patients in 36 acute care hospitals [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008, 29(11): 1035-1041.
- [17] Willis C, Morley R, Westbury J, *et al.* Evaluation of ATP bioluminescence swabbing as a monitoring and training tool for effective hospital cleaning [J]. J Infect Prev, 2007, 8(5): 17-21.
- [18] Boyce J M, Havill N L, Dumigan D G, *et al.* Monitoring the effectiveness of hospital cleaning practices by use of an adenosine triphosphate bioluminescence assay [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009, 30(7): 678-684.
- [19] Boyce J M, Havill N L, Lipka A, *et al.* Variations in hospital daily cleaning practices [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010, 31(1): 99-101.
- [20] Dancer S J, White L F, Lamb J, *et al.* Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study [J]. BMC Med, 2009, 7:28.
- [21] Boyce J M, Potter-Bynoe G, Chenevert C, *et al.* Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(9): 622-627.
- [22] French G L, Otter J A, Shannon K P, *et al.* Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination [J]. J Hosp Infect, 2004, 57(1): 31-37.
- [23] Rutala W A. APIC guideline for selection and use of disinfectants. 1994, 1995, and 1996 APIC Guidelines Committee. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. [J]. Am J Infect Control, 1996, 24(4):314-342.

(上接第 230 页)

- [13] Thomas W, Loehfelm, Nicole R, *et al.* Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein [J]. J Bacteriol, 2008, 190(3): 1036-1044.
- [14] Jennifer A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation [J]. Future Microbiol, 2009, 4: 273-278.
- [15] Srinandan C S, Jadav V, Cecilia D, *et al.* Nutrients determine the spatial architecture of *Paracoccus sp.* biofilm [J]. Biofouling, 2010, 26(4): 449-459.
- [16] Miranda J, Alan C, Julie A. Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* newman requires *ica* and the secreted protein *emp* [J]. Infect Immun, 2008, 76(4):1756-1765.
- [17] Sarkisova S, Patrauchan M A, Berglund D. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. J Bacteriol, 2005, 187(13):4327-4337.
- [18] Banin E, Keith M, Brady E. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(3):2064-2069.
- [19] Andrew P, Tomaras T, Michael J. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology [J]. Microbiology, 2008, 154(11):3398-3409.
- [20] Gaddy J A, Tomaras A P, Actis L A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells [J]. Infect Immun, 2009, 77(8):3150-3160.
- [21] Grudzinski L, Quinan P, Kwok S, *et al.* Sodium citrate 4% locking solution for central venous dialysis catheters—an effective, more cost-efficient alternative to heparin [J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(2):471-476.
- [22] Stanley N R, Lazazzera B A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation [J]. Mol Microbiol, 2004, 52(4):917-924.
- [23] de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, *et al.* CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response [J]. Res Microbiol, 2009, 160(3):213-218.