

黏液型铜绿假单胞菌生物膜形成的研究进展

Research advances on biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*

高巧营(GAO Qiao-ying) 综述 吴尚为(WU Shang-wei) 审校

(天津医科大学病原微生物室,天津 300070)

(Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[关键词] 铜绿假单胞菌,黏液型;生物膜;藻酸盐;抗药性,微生物;*mucA* 基因[中图分类号] R378.99⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2011)02-0158-03

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是引起菌血症、泌尿系感染及多种慢性呼吸道疾病的重要病原菌,也是医院感染的主要病原菌之一。根据菌落形态及是否产生大量藻酸盐,可将 PA 分为黏液型和非黏液型 2 个型别^[1]。黏液型和非黏液型菌株表现出不同的致病性和抗菌药物耐药性,是目前细菌学中非常活跃的研究领域,本文就黏液型 PA 及生物膜形成的研究进展作一综述。

1 生物膜

生物膜(biofilm)是细菌为适应环境、利于生存,在黏附于生命或无生命物体表面时分泌的由多种多糖蛋白组成的复合物,也被称作胞外基质;其可使细菌相互粘连,形成一种特殊细菌群体。细菌的胞外基质具有复杂的功能,作为生物膜结构支架,有抵抗抗生素杀菌的作用^[2]。多聚糖成分 Pel 和 Psl 为胞外基质主要成分, Psl 富含甘露糖, Pel 富含葡萄糖,两者在细菌生物膜形成中起重要作用^[3]。当细菌分泌过多 Psl 和 Pel 时,细菌表型将发生变异^[4]。

生物膜的形成是动态过程,包括可逆性黏附、不可逆性黏附、微菌落形成、生物膜形成和解聚几个阶段。细菌配体与固相表面上的受体结合^[5],细菌可逆性黏附于固相表面,当多个黏附的细菌聚集成菌落基底后,细菌的密度感应系统(quorum sensing system, QS)开始启动,细菌产生大量胞外基质,其与细菌黏结成微菌落。随着 QS 的不断作用,菌落

厚度增加,此时细菌处于休眠状态,细菌生物膜进入成熟阶段。

2 黏液型 PA 与生物膜

2.1 黏液型 PA 的生物膜 黏液型 PA 的生物膜是由蘑菇样或柱样亚单位组成,亚基间连接紧密,不易破坏,导致细菌具有较强存活能力。成熟生物膜蘑菇样顶端成分为鼠李糖,鼠李糖脂与成熟生物膜中的水通路有关^[6]。与 PA 生物膜相关的 QS 系统是: LasRI 和 RhIR1 系统^[7]、PQS^[8], 3 个系统相互联系^[8]。黏液型 PA 比非黏液型 PA 更易形成生物膜,且厚度更大,这可能是其临床不易治愈的原因之一。

2.2 黏液型 PA 生物膜的耐药机制 PA 的耐药机制主要包括:产生抗菌药物灭活酶或修饰酶;抗菌药物作用靶位的改变;细菌外膜对抗菌药物的屏障作用和/或主动外排;形成生物膜。生物膜形成介导的耐药性为黏液型 PA 较为特别的机制,其耐药机制如下。(1)弥散屏障:生物膜具有独特的三维结构,对抗菌药物有不同的渗透活性,阻挡抗菌药物向生物膜内的 PA 渗透,使进入细菌体内的药物浓度降低,作为保护屏障使 PA 表现出耐药性;另外,胞外多糖中含有高浓度的抗菌药物水解酶,也可使抗菌药物失效。(2)微环境梯度:生物膜中的营养成分、代谢产物浓度、渗透压和氧浓度等,由外向内呈梯度下降;生物膜内部的细菌处于“饥饿状态”,生长

[收稿日期] 2010-10-25

[作者简介] 高巧营(1982-),女(汉族),河北省沧州市人,研究生,主要从事分子流行病学研究。

[通讯作者] 吴尚为 E-mail: shangwei10021@yahoo.com.cn

缓慢或停止,对药物的敏感性也下降;而残存的 PA 可利用死亡细菌作为营养源迅速繁殖形成新的生物膜。(3)抵抗表型:生物膜产生后,细菌可表达一些特殊的、具有保护性的生物表型,从而导致耐药;有研究^[9]发现,成熟生物膜中 PA 的抗菌药物最低抑菌浓度比悬浮菌高 1 000~2 000 倍。研究^[10]已表明,生物膜内细菌可分泌 β -内酰胺酶水解头孢类抗生素,氨基苷类抗菌药物可与膜内细菌的外周多糖相互作用。

3 藻酸盐与 *mucA* 基因

3.1 藻酸盐 藻酸盐是一种阴离子黏性多糖复合物,分为海藻藻酸盐和细菌藻酸盐。细菌藻酸盐是一种乙酰化的线性多糖,以多聚古洛糖醛酸、多聚甘露糖醛酸及混合多聚物 3 种形式不同的比例存在于藻酸盐分子中。藻酸盐是黏液型 PA 生物膜胞外多聚基质中的主要成分,也是 PA 生物膜的毒力因子^[1],但藻酸盐的产生与生物膜形态无关^[9]。

3.2 *mucA* 基因 *mucA* 基因是藻酸盐合成的最重要的负性调节基因,是造成 PA 发生黏液型转换的主要机制。*mucA* 基因编码的内膜蛋白 MucA 具有抗铜绿假单胞菌 *algU* 的作用,后者可直接影响藻酸盐的合成增加。*mucA* 基因突变导致 MucA 变化,失去抗 *algU* 的作用,使藻酸盐合成增加。虽 *mucA* 基因突变是 PA 产生黏液表型的重要因素,

但非唯一因素,*mucB*、*mucD*、*algT* 及 *algW* 等基因对调节藻酸盐合成也发挥作用。

4 黏液型与非黏液型 PA

碳和氮均可以作为 PA 的能量来源,故 PA 在有氧和无氧环境中均能生存^[7,11]。黏液型 PA 是 PA 的特殊自然表型,与非黏液型有所不同^[12],其具备 PA 的基本生物学特征,氧化酶阳性,临床经常用氧化酶试验鉴定黏液型 PA 与其他能形成黏液型菌落的细菌,如肺炎克雷伯菌。黏液型 PA 多分离于老年患者、反复慢性感染者,抗菌药物治疗效果极差^[1];这与其产生多种毒力因子有关,如磷脂酶 C、外毒素 A、内毒素 S、脂多糖^[7]。黏液型和非黏液型 PA 可相互转变^[12],但转变体血清型无明显差异^[13]。临床检验中,黏液型 PA 的分离率远低于非黏液型;体外药敏试验中,非黏液型 PA 对抗菌药物的耐药率明显高于黏液型 PA^[13]。这主要是因为体外药敏试验只测试浮游状态的细菌,不能反映生物膜介导的耐药性,造成实验室检测和临床治疗效果之间的矛盾。如 PA 对复方磺胺甲噁唑天然耐药,体外药物敏感试验发现,非黏液型 PA 符合这一规律,而黏液型 PA 有 47% 的菌株对其敏感^[14]。因此,治疗黏液型 PA 时应注意因生物膜产生的耐药性对治疗效果的影响,以免造成误判。黏液型 PA 与非黏液型 PA 的差别见表 1。

表 1 黏液型 PA 与非黏液型 PA 的差别

PA	菌落性状	藻酸盐	<i>mucA</i>	黏附能力	体外对抗菌药物耐药性
黏液型	无金属光泽 无特殊香味	量多 高 2~6 倍 ^[14]	突变	强 高 10~100 倍 ^[15]	弱
非黏液型	蓝绿色或黄绿色 生姜气味	量少	未见突变报道	弱	强 多药耐药率高

5 生物膜研究在黏液型 PA 治疗中的应用进展

5.1 减少藻酸盐 藻酸盐作为生物膜胞外基质的主要成分,受到广泛重视,研究热点主要有:(1)减少藻酸盐合成:调控藻酸盐合成基因,用基因工程方法抑制藻酸盐合成;大环内酯抗生素能抑制合成藻酸盐关键酶的活性,减少藻酸盐合成。(2)消耗合成的藻酸盐:藻酸盐单克隆抗体与藻酸盐结合,干扰生物膜形成;藻酸盐裂解酶降解藻酸盐成单糖形式,降低细菌黏附性。

5.2 影响细菌信号传递系统 细菌信号传递系统对生物膜形成和生物膜结构稳定起关键性作用,被认为是消灭细菌生物膜最有希望的突破口。阿奇霉素是细胞间信号阻断剂,可使 PA 生物膜形成所需的 3OC12—HSL 和 C4—HSL 生成减少^[6]。多磷酸酯激酶(polyphosphate kinase, PPK)只存在于微生物中,能影响 QS 系统,影响生物膜形成,且不易激发耐药性,故其可作为控制黏液型 PA 生物膜相关感染的治疗靶标。

5.3 其他 生物膜形成初期,乳铁蛋白通过螯合铁促进菌毛颤播,使 PA 不易黏附,不能形成成熟生物

膜^[16]。故可采用铁螯合剂对抗 PA 生物膜形成。鉴于 Allison 等观察的 PA 生物膜的自毁现象开展的相关研究;运用氧化磷化阻断剂,诱导可消化基质的种属特异的胞外多糖裂解酶的表达;开发能与细菌生物膜自毁成分相互作用的新型药物。

6 结语

PA 作为重要的感染病原菌,随其多重耐药菌株的出现,其耐药机制成为国内外学者研究的重点,尤其生物膜耐药机制已成为研究的焦点。黏液型 PA 作为 PA 的特殊类型,其生物膜的耐药机制尤为突出,导致感染患者难以治愈。通过研究已取得了一定成果,但仍未找到有效、完全去除生物膜的方法。随其相关研究的深入,通过拮抗生物膜形成可能是防治难治性 PA 感染的最有效方法。

【参考文献】

- [1] Wagner V E, Iglewski B H. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2008, 35 (5): 124 - 134.
- [2] Borlee B R, Goldman A D, Murakami K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix [J]. Mol Microbiol, 2010, 75 (4): 827 - 842.
- [3] Ma L, Lu H, Sprinkle A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose-and mannose-rich exopolysaccharide [J]. J Bacteriol, 2007, 189(22): 8353 - 8356.
- [4] Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, et al. The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation [J]. Microbiology, 2005, 151(3): 985 - 997.
- [5] Starkey M, Hickman J H, Ma L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small colony variants have adaptations likely to

- promote persistence in the cystic fibrosis lung [J]. J Bacteriol, 2009, 191(11): 3492 - 3503.
- [6] Pamp S J, Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(6): 2531 - 2539.
- [7] 宋世会, 田德英, 陈安群, 等. 三株黏液型铜绿假单胞菌的生物学特性研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30 (11): 1281 - 1283.
- [8] Rasmussen T B, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects [J]. Microbiology, 2006, 152(4): 895 - 904.
- [9] 吴会玲, 田德英, 陈安群, 等. *muca* 基因突变的黏液型铜绿假单胞菌 PA17 与 PD0300 生物被膜形态观察和耐药性比较 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(5): 572 - 575.
- [10] Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases [J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(2): 95 - 108.
- [11] O'May C Y, Reid D W, Kirov S M. Anaerobic culture conditions favor biofilm-like phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 48(3): 373 - 380.
- [12] 冯志山, 侯天文. 黏液型铜绿假单胞菌的检出及其临床意义 [J]. 中国综合临床, 2007, 23(9): 835 - 836.
- [13] Wood L F, Leech A J, Ohman D E. Cell wall—inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: roles of sigma (A1gT) and the AlgW and Prc proteases [J]. Mol Microbiol, 2006, 62(2): 412 - 426.
- [14] 孙淑红, 胡晓峰, 刘晓红, 等. 黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌耐药性比较 [J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 12(6): 345 - 348.
- [15] Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung [J]. Microbiology, 1999, 145(6): 1349 - 1357.
- [16] Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, et al. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *P. aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in C₃H (-/-) mice [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3677 - 3687.

欢迎登录《中国感染控制杂志》网站 <http://www.zggrkz.com>

《中国感染控制杂志》网站 <http://www.zggrkz.com> 于 2010 年 7 月正式开通,同时启用稿件远程处理系统(远程投稿请点击左上角“作者在线投稿”并注册,注册成功后进行投稿、查询)。欢迎广大医务工作者登录、浏览和赐稿。