

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.09.016

· 综述 ·

## 生物被膜预防与治疗进展

### Research advances in the prevention and treatment of biofilm

袁展望(YUAN Zhan-wang), 李武平(LI Wu-ping), 刘冰(LIU Bing), 孙惠英(SUN Hui-ying), 杨凡(YANG Fan)

(第四军医大学第一附属医院西京医院, 陕西 西安 710032)

(Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[关键词] 细菌; 生物被膜; 医院感染; 抗感染治疗; 噬菌体

[中图分类号] R378 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2014)09-0571-04

生物被膜(biofilm, BF)是指细菌黏附于植入的医疗器械或受损组织, 将其自身包裹在含水的多糖基质和蛋白质中, 形成黏质状态, 显微镜下观察可见通过胞外聚合物结合的细菌密集的聚集物<sup>[1]</sup>。BF的形成过程包括 5 个阶段, 分别为黏附期、种植期、生长期、成熟期和播散期。种植期的细菌黏附是不可逆的, 多形成微菌落。研究<sup>[2]</sup>发现, 成熟的 BF 通常由内层、中层和外层 3 层结构组成, 内层是调节膜, 该结构未完全覆盖生物或非生物体表面, 而是形成网格样结构; 中层是紧密的微生物基底膜; 外层是漂浮的表面膜, 为浮游生物的聚居地, 浮游生物可自由漂浮, 扩散到其他区域引起急性感染或形成新的 BF。早在 1676 年, Antonie van Leeuwenhoek 便从牙菌斑中观察到细菌 BF; 但直到 1978 年, Costerton 等才首次提出 BF 的相关理论, 并在 1982 年证明了细菌在异物上具有黏附性, 其黏附性与异物结合的牢固程度取决于细菌表面的生化特性及惰性表面的物理化学性质。1987 年, Costerton 又提出 BF 致病性问题<sup>[3]</sup>。医院感染与 BF 黏附的生物材料(如中心静脉导管、导尿管、心脏瓣膜修补以及骨科植入假体等)有关。尽管患者感染的微生物及感染部位不同, 但均具有相似特征, 即被膜中的细菌能够逃避宿主的免疫防御, 并抵制抗菌药物的作用。预防及抑制 BF 的生长成为控制医院感染的重要措施, 现将相关研究总结如下。

#### 1 反义引物治疗

细菌潜在基因对细胞毒性有重要作用, 反义引物治疗成为抑制 BF 形成的方法之一。微生物表面成分识别基质分子(microbial surface components recognizing adhesive Matrix Molecules, MSCRAMMs)是一个黏附家族, 其作用是调节细菌在生物材料上的黏附, 如 *ica* 转座子是产生促使细胞黏附的胞外多糖的潜在基因<sup>[4]</sup>, 是许多葡萄球菌属 BF 的胞外基质成分。编码细菌黏附素和被膜形成基因是反义引物药物的潜在靶点。多肽核酸(peptide nucleic acids, PNAs)是 DNA 类似物, 其生化性质稳定, 不被核酸酶和蛋白酶消化降解, 在抑制细菌和病毒的基因表达、蛋白质翻译方面取得了初步成果, 可成为反义作用治疗药物<sup>[5]</sup>。至今, 人们在潜在黏附基因方面尚未取得成功, 但为分子水平预防 BF 提出了新的理念。

#### 2 密度信号感应系统抑制剂

这种方法是干扰细菌细胞间通信的密度信号感应抑制剂。葡萄球菌的密度感应系统包括核糖核酸-III 激活肽(ribonucleic-acid-III-activating peptide, RAP)和他的靶蛋白(target of RAP, TRAP)<sup>[6]</sup>。葡萄球菌通过 RNA-III 抑制肽(RIP)抑制其毒性, 主要机制是 RIP 抑制 TRAP 的磷酸化作

[收稿日期] 2014-05-09

[作者简介] 袁展望(1986-), 女(汉族), 陕西省户县人, 护师, 主要从事医院感染控制与重症监护研究。

[通信作者] 李武平 E-mail: liwuping@fmmu.edu.cn

用,降低细胞黏附性,从而有效抑制毒素的合成。研究<sup>[7]</sup>表明,TRAP 在氧化应激过程中保护细菌 DNA。葡萄球菌属 TRAP 是保守的,因此,理论上,RIP 能抑制任何葡萄球菌属引发的感染,包括耐甲氧西林和耐万古霉素的菌株。动物模型中合成的 RIP 对异物相关感染有效,未来可能成为抗菌剂的替代疗法或者辅助治疗<sup>[8-10]</sup>。

### 3 噬菌体

噬菌体是一种感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒总称,是细菌的天敌,在 BF 调节中有一定的作用。典型的噬菌体侵染细菌的过程可以分为 3 个阶段:感染阶段、增殖阶段和成熟阶段。体外实验研究<sup>[11-13]</sup>表明,细菌噬菌体可产生多糖解聚酶,水解 BF 基质中的聚合物,且能够表达 BF 降解酶,攻击被膜中的细菌和被膜基质。与生物酶噬菌体相比,工程酶噬菌体对抑制 BF 有更强的体外药效。体外模型<sup>[14-15]</sup>中,将水凝胶预处理的硅胶导尿管涂覆表皮葡萄球菌噬菌体或 5 种铜绿假单胞菌噬菌体的混合物,能够降解 BF 结构。体外研究<sup>[16]</sup>指出,金黄色葡萄球菌特异性噬菌体(CT-SA)能够有效清除临床分离的 BF 菌株。利用噬菌体的特性预防细菌定植和继发性感染将会有更广泛的应用前景。

此外,噬菌体在食品安全方面起到举足轻重的作用。空肠弯曲杆菌广泛存在于鸟、禽、狗、猫等动物体内,可通过污染肉、奶及未经消毒处理的水而导致感染。噬菌体能够替代传统的抗菌剂抑制食源性微生物。研究<sup>[17]</sup>已证明弯曲杆菌噬菌体能够减少存在于鸡表皮和生/熟牛肉上的空肠弯曲杆菌。

### 4 提高抗菌药物活性

电流(EC)和超声已成为破坏 BF 和治疗感染的辅助手段。

4.1 生物电效应 生物电效应是通过电流的作用,增强抗菌活性,破坏被膜基质,增加细胞膜通透性,并电解产生氧气和氧化剂<sup>[18]</sup>。将涂覆有 BF 的聚四氟乙烯取样管暴露于新鲜培养基中,干预措施为有或无抗菌剂、有或无电流,结果显示,有电流干预组中,万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) BF

效果显著,达托霉素/红霉素对表皮葡萄球菌 BF 效果显著<sup>[19]</sup>。体外实验<sup>[20]</sup>和大鼠异物相关骨髓炎模型<sup>[21]</sup>中,无抗菌制剂时,电流对细菌 BF 也有效。

4.2 生物声学效应 生物声学效应是指超声和抗微生物制剂在杀灭细菌 BF 中的协同作用。超声和庆大霉素同时作用于聚乙烯材料上,能够降低铜绿假单胞菌 BF 的活性<sup>[22]</sup>。动物感染模型中已证实<sup>[23]</sup>,低频超声波比高频超声波能更好地降低 BF 内细菌的活性<sup>[24]</sup>。超声增强了庆大霉素的跨 BF 运输,无超声时,抗菌药物的运输被阻止或减慢<sup>[25]</sup>;低频超声增加了铜绿假单胞菌的外膜通透性<sup>[24]</sup>;通过机械作用,高强度聚焦超声可以分裂生长在显微载玻片上的大肠埃希菌 BF<sup>[26]</sup>。

临床实践中,超声可以提高骨黏合剂中抗菌药物对生物被膜菌的抗菌效果。大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌分别在体外与负载庆大霉素或庆大霉素与克林霉素的骨黏合剂联合应用,可降低浮游细菌和被膜细菌的活性<sup>[27]</sup>。动物实验中,在兔子体内植入庆大霉素骨黏合剂圆盘,其上有大肠埃希菌 BF,术后 24~72 h 使用超声波,可提高庆大霉素的杀菌作用<sup>[28]</sup>。皮肤组织病理学检查显示,应用脉冲超声无不良反应。然而,将这些新技术应用于人类前,还应做进一步的体外实验和动物研究。

### 5 材料表面的改变

目前,已有相关抗黏附材料的报道。Tiller 等<sup>[29]</sup>发现,共价键连接的多聚物(4-vinyl-N-hexylpyridinium bromide,4-乙烯基-N-己基吡啶溴化物)形成的载玻片无菌表面,能够有效抑制表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的黏附。聚合物(聚氧化乙烯,PEO)的流动性极高,具有非常大的排斥力,颗粒物(如蛋白质分子)很难进入其表面<sup>[30]</sup>。Roosjen 等<sup>[31]</sup>研究表明,玻璃表面的 PEO 通过降低细胞和玻璃表面间的范德华力(Lifshitz-van der Waals),抑制细菌和酵母菌的黏附。这是因为聚合物有不同的官能团和结构变形,研究<sup>[32-33]</sup>已提出将其应用于控制蛋白质和细菌的黏附。

辐射诱导接枝聚合法(RIGP)可以在主链上引入常见的聚合物,如聚乙烯(PE),接枝链的密度和长度可通过调整电子束照射的时间和乙烯基单体的反应时间来控制<sup>[34]</sup>。RIGP 还可以对各种单体进行化学修饰,使其化学链有特殊的功能,如预防或促进

细菌的黏附。Terada 等<sup>[35]</sup>利用 RIGP 在 PE 中加入带负电荷的甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA),通过环氧基开环反应(epoxy-ring-opening reaction)转化为带正电荷的二乙基氨(DEA)。研究显示<sup>[36-37]</sup>,很难形成 BF 的硝化细菌在含有 DEA 的 PE 表面成功地形成 BF,初始黏附率比原 PE 表面高 6~10 倍,细菌黏附量高 3 倍。

与此相反, Gottenbos 等<sup>[38]</sup>研究表明,黏附到带正电荷的表面细菌活性增强,但随后的 BF 形成速度减慢,提示带正电荷的表面不利于 BF 生长。Terada 等<sup>[39]</sup>指出,约 80% 的大肠埃希菌和 60% 的枯草芽孢杆菌在黏附到强正电荷的表面后,8 h 被灭活。

综上所述,目前已提出多种方法预防 BF,主要包括分子水平的预防和降解策略,提高抗菌药物活性,改变材料成分抑制细菌黏附或生长。虽然,这些方法尚处于体外研究阶段,但为未来医院感染的预防控制指明了新的方向。

#### [参 考 文 献]

[1] Costerton J W, Stewart P S. Biofilms and device-related infections. In: Nataro J P, Blaser M J, Cunningham-Rundles S, eds. Persistent bacterial infections [M]. Washington, DC: ASM Press, 2000: 432 - 439.

[2] Keane P F, Bonner M C, Johnston S R. Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents in vivo[J]. Br J Urol, 1994, 73(6): 687 - 691.

[3] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. Science, 1999, 284(5418): 1318 - 1322.

[4] OGara J P. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 270(2): 179 - 188.

[5] 黄学文, 诸葛洪祥. 多肽核酸在分子生物学中的应用 [J]. 医学分子生物学杂志, 2008, 4(6): 549 - 552.

[6] Balaban N, Stoodley P, Fux C A, et al. Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 437: 48 - 54.

[7] Kiran M D, Balaban N. TRAP plays a role in stress response in *Staphylococcus aureus* [J]. Int J Artif Organs, 2009, 32(9): 592 - 599.

[8] Anguita-Alonso P, Giacometti A, Cirioni O, et al. RNAIII-inhibiting-peptide-loaded polymethylmethacrylate prevents in vivo *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(7): 2594 - 2596.

[9] Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, et al. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhib-

itor RIP [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(6): 2226 - 2229.

[10] Cirioni O, Ghiselli R, Minardi D, et al. RNAIII-inhibiting peptide affects biofilm formation in a rat model of staphylococcal ureteral stent infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(12): 4518 - 4520.

[11] Cerca N, Oliveira R, Azeredo J. Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* planktonic cells and biofilms to the lytic action of *Staphylococcus* bacteriophage K [J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45(3): 313 - 317.

[12] Sharma M, Ryu J H, Beuchat L R. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage [J]. J Appl Microbiol, 2005, 99(3): 449 - 459.

[13] Lu T K, Collins J J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(27): 11197 - 11202.

[14] Curtin J J, Donlan R M. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(4): 1268 - 1275.

[15] Fu W, Forster T, Mayer O, et al. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1): 397 - 404.

[16] Drilling A, Morales S, Jardeleza C, et al. Bacteriophage reduces biofilm of *Staphylococcus aureus* ex vivo isolates from chronic rhinosinusitis patients [J]. Am J Rhinol Allergy, 2014, 28(1): 3 - 11.

[17] Siringan P, Connerton P L, Payne R J, et al. Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(10): 3320 - 3326.

[18] del Pozo J L, Rouse M S, Patel R. Bioelectric effect and bacterial biofilms. A systematic review [J]. Int J Artif Organs, 2008, 31(9): 786 - 795.

[19] del Pozo J L, Rouse M S, Mandrekar J N, et al. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 35 - 40.

[20] del Pozo J L, Rouse M S, Mandrekar J N, et al. The electricidal effect: reduction of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* biofilms by prolonged exposure to low-intensity electrical current [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 41 - 45.

[21] Del Pozo J L, Rouse M S, Euba G, et al. The electricidal effect is active in an experimental model of *Staphylococcus epidermidis* chronic foreign body osteomyelitis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(10): 4064 - 4068.

[22] Qian Z, Sagers R D, Pitt W G. The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P. aeruginosa* biofilms [J]. Ann Biomed Eng, 1997, 25(1): 69 - 76.

[23] Rediske A M, Roeder B L, Nelson J L, et al. Pulsed ultrasound

enhances the killing of *Escherichia coli* biofilms by aminoglycoside antibiotics in vivo[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(3): 771 - 772.

- [24] Carmen J C, Nelson J L, Beckstead B L, et al. Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*[J]. *J Infect Chemother*, 2004, 10(4): 193 - 199.
- [25] Runyan C M, Carmen J C, Beckstead B L, et al. Low-frequency ultrasound increases outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2006, 52(5): 295 - 301.
- [26] Bigelow T A, Northagen T, Hill T M, et al. The destruction of *Escherichia coli* biofilms using high-intensity focused ultrasound[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2009, 35(6): 1026 - 1031.
- [27] Ensing G T, Neut D, van Horn J R, et al. The combination of ultrasound with antibiotics released from bone cement decreases the viability of planktonic and biofilm bacteria: an in vitro study with clinical strains[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58(6): 1287 - 1290.
- [28] Ensing G T, Roeder B L, Nelson J L, et al. Effect of pulsed ultrasound in combination with gentamicin on bacterial viability in biofilms on bone cements in vivo[J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 99(3): 443 - 448.
- [29] Tiller J C, Liao C J, Lewis K, et al. Designing surfaces that kill bacteria on contact[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(11): 5981 - 5985.
- [30] Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications[M]. Springer, 1992.
- [31] Roosjen A, Kaper H J, van der Mei H C, et al. Inhibition of adhesion of yeasts and bacteria by poly(ethylene oxide)-brushes on glass in a parallel plate flow chamber[J]. *Microbiology*, 2003, 149(11): 3239 - 3246.
- [32] Kingshott P, Thissen H, Griesser H J. Effects of cloud-point

grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(9): 2043 - 2056.

- [33] Kingshott P, Wei J, Bagge-Ravn D, et al. Covalent attachment of poly (ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion[J]. *Langmuir*, 2003, 19(17): 6912 - 6921.
- [34] Kawai T, Saito K, Lee W. Protein binding to polymer brush, based on ion-exchange, hydrophobic, and affinity interactions [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 790(1): 131 - 142.
- [35] Terada A, Yuasa A, Tsuneda S, et al. Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, 43(2): 99 - 107.
- [36] Terada A, Yamamoto T, Hibiya K, et al. Enhancement of biofilm formation onto surface-modified hollow-fiber membranes and its application to a membrane-aerated biofilm reactor[J]. *Water Sci Technol*, 2004, 49(11 - 12): 263 - 268.
- [37] Hibiya K, Tsuneda S, Hirata A. Formation and characteristics of nitrifying biofilm on a membrane modified with positively-charged polymer chains [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2000, 18(2): 105 - 112.
- [38] Gottenbos B, Grijpma D W, van der Mei H C, et al. Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(1): 7 - 13.
- [39] Terada A, Yuasa A, Kushimoto T, et al. Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces[J]. *Microbiology*, 2006, 152(12): 3575 - 3583.

(本文编辑:左双燕)

(上接第 567 页)

## [参 考 文 献]

- [1] Raboud J, Saskin R, Wong K, et al. Patterns of handwashing behavior and visits to patients on a general medical ward of healthcare workers[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004, 25(3): 198 - 202.
- [2] 冯笑峰, 赵玲华. 手部卫生与患者安全[J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, 18(12): 1745 - 1746.
- [3] Boyce J M, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Health-

care Epidemiology of America/Association for Professionals in Infection Control/Infectious Diseases Society of America[J]. *MMWR Recomm Rep*, 2002, 51(RR - 16): 1 - 45.

- [4] 王艳红, 刘素珍, 钟慧仪, 等. 护士手卫生的认知现状调查[J]. *中国循证医学杂志*, 2006, 6(9): 641 - 645.
- [5] Zimakoff J, Kjelsberg A B, Larsen S O, et al. A multicenter questionnaire investigation of attitudes toward hand hygiene, assessed by the staff in fifteen hospitals in Denmark and Norway[J]. *Am J Infect Control*, 1992, 20(2): 58 - 64.
- [6] 何文英, 黄新玲, 史晨辉, 等. 医务人员执行手卫生的影响因素[J]. *中国消毒学杂志*, 2010, 27(6): 758 - 759.

(本文编辑:付陈超)