

# 铜绿假单胞菌生物被膜对抗菌药物作用影响的实验研究\*

冯星火<sup>1</sup> 赵广福<sup>1</sup> 崔连东<sup>2</sup> 关欣<sup>3</sup> 王宏达<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 辽宁省人民医院呼吸内科 沈阳 110015)

(<sup>2</sup> 辽宁省人民医院检验科 沈阳 110015)(<sup>3</sup> 中国医科大学附属一院 沈阳 110001)

**摘 要:**细菌生物被膜形成在难治性感染中起重要作用,本实验在体外进行铜绿假单胞菌生物被膜与抗菌药物作用的研究。铜绿假单胞菌在生理盐水-特氟隆系统孵育 6d,可在特氟隆表面上形成细菌生物被膜(Biofilm),经扫描电镜证实,它包裹在微菌落表面。应用环丙氟哌酸,甲红霉素,罗红霉素,穿心莲作用于生物被膜细菌并观察结果。发现与 2 倍 MIC 环丙氟哌酸作用 4h 后,悬浮细菌存活率降至 0.02%,但生物被膜细菌存活率则为 41%,当 10 $\mu$ g/mL 甲红霉素,12 $\mu$ g/mL 罗红霉素,0.05g/mL 穿心莲分别与环丙氟哌酸联合应用时,生物膜细菌存活率分别降至 0.2%,0.5%和 2.7%。结果表明生物被膜细菌对环丙氟哌酸的抵抗力较悬浮细菌明显增强,而环丙氟哌酸分别与甲红霉素,罗红霉素,穿心莲联合应用则有明显抑菌作用。推测此种联合用药方式可能提高对难治性感染的治疗效果。

**关键词:**细菌生物被膜,铜绿假单胞菌,抗菌药物

**中图分类号:**Q939.11 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2000)02-0210-13

1978 年 Costerton 首先发现并提出了生物被膜(Biofilm)理论<sup>[1]</sup>。有生物被膜的细菌具有极强的抗药性及抗吞噬、抗趋化作用,是难治性感染的重要原因之一。本实验在体外培养出产生生物被膜的铜绿假单胞菌,经电镜证实它的存在,并测定其对环丙氟哌酸的抗药性。然后观察了甲红霉素、罗红霉素、穿心莲与环丙氟哌酸联合应用对该菌的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及药物

细菌是由一支气管扩张症病人痰中分离鉴定的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。环丙氟哌酸(Ciprofloxacin, CPM)广州侨光制药厂生产。甲红霉素(Clarithromycin, CAM)由美国雅培实验室提供。罗红霉素(Roxithromycin, ROX)由法国罗素优克福公司提供。穿心莲(Herba Andrographitis, HA)中药由辽宁省医药采购供应站提供。按戴自英所述方法提取有效成份<sup>[2]</sup>。

### 1.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定

最小抑菌浓度(MIC)的测定采用琼脂平板稀释法。

\* 本课题为辽宁省科学技术委员会资助(96803006)

作者简介:冯星火(1965—),男,辽宁沈阳人,硕士,辽宁省人民医院呼吸内科工作

收稿日期:1998-12-04,修回日期:1999-06-14

### 1.3 铜绿假单胞菌生物被膜的制备

将铜绿假单胞菌接种在胰酶解酪蛋白大豆肉汤中 37℃ 培养过夜,用无菌生理盐水离心洗两次,再用生理盐水重新悬浮。用分光光度计 560nm 测定其吸光度值。使菌悬液的 OD 值达 0.029(相当的细菌数约为  $10^7$ CFU/mL)。将此菌悬液用生理盐水稀释 10 倍,将特氟隆片(10mm×10mm)放入盛有 5mL 菌悬液的试管内,37℃ 培养,分别在第 1 天和第 6 天,用扫描电镜观察生物被膜形成情况。

### 1.4 抗菌药物对生物被膜细菌的影响

当特氟隆片在 37℃ 生理盐水菌液内孵育 6d,取出用生理盐水轻洗后,将其放入含 2mL 的生理盐水的试管内,置旋涡振荡器上振荡 2min。此试管内的细菌为生物被膜细菌,原来的生理盐水中未吸附到特氟隆片上的细菌为悬浮菌。分别在生物被膜细菌及悬浮菌的菌液中加入 CPFX、CAM、ROX 和穿心莲。CPFX 分别与其它三种药物联合作用。37℃ 培养,分别在 0、1、2、4h 取定量菌悬液(0.1mL),加到水解酪蛋白琼脂平板上用 L 棒涂匀,进行过夜培养,计录菌落数。计算不同时间细菌的存活率。

## 2 结果

### 2.1 铜绿假单胞菌生物被膜的形成

特氟隆片在生理盐水菌悬液(菌悬液浓度为  $10^6$ CFU/mL)中放置 24h 用扫描电镜观察看到许多铜绿假单胞菌已粘附到特氟隆片上,未形成生物被膜(图 1)。放置 6d,在特氟隆片的表面已形成了生物被膜,并将铜绿假单胞菌包绕其中(图 2)。

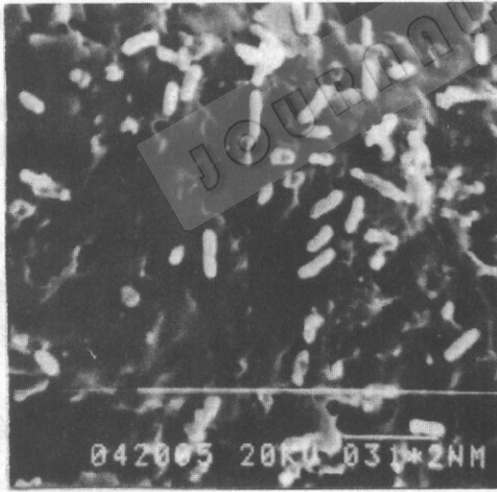


图 1 未形成生物被膜的铜绿假单胞菌

Fig.1 *P. aeruginosa* of the unformating biofilm under scanning electron-microscope

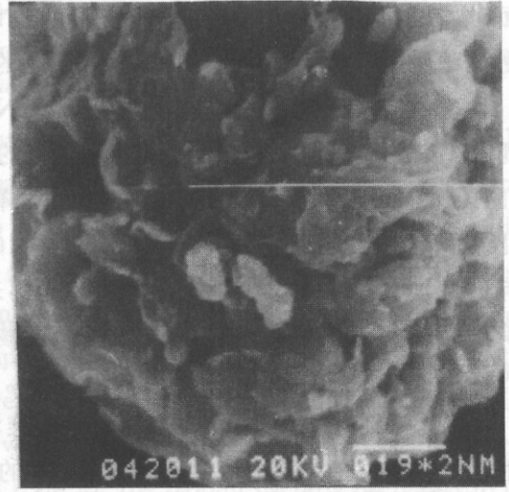


图 2 已形成生物被膜的铜绿假单胞菌

Fig.2 *P. aeruginosa* of the forming biofilm under scanning electron-microscope

### 2.2 CPFX、CAM、ROX 及穿心莲对铜绿假单胞菌的 MIC

对悬浮菌 CPFX 为  $0.4\mu\text{g/mL}$ ,CAM、ROX  $>200\mu\text{g/mL}$ ,穿心莲  $>200\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.3 铜绿假单胞菌产生生物被膜后对 CPFX 的抗药性

生物被膜细菌和非生物被膜细菌对 2MIC 的 CPFX( $0.8\mu\text{g/mL}$ )的不同时间存活率,生物被膜铜绿假单胞菌经 4h 存活率为 41%;非生物膜铜绿假单胞菌经过 4h 存活率为

0.02%。

#### 2.4 CAM, ROX, 穿心莲对生物被膜 铜绿假单胞菌的清除作用

分别用 CAM、ROX, 穿心莲及 CPFY + CAM, CPFY + ROX, CPFY + 穿心莲作用生物被膜细菌不同时间后计算存活率,  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CAM,  $12\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ROX 及  $0.05\text{g}/\text{mL}$  的穿心莲单独作用几乎不影响细菌的存活率; 而联合应用  $0.8\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CPFY 与  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CAM 作用 4h 时生物被膜细菌的存活率降至 0.2%。联合应用  $0.8\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CPFY 与  $12\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ROX 作用 4h 生物被膜细菌的存活率降至 0.5%。 $0.8\mu\text{g}/\text{mL}$  CPFY 作用 4h 细菌存活率降至 40%; 而联合应用  $0.8\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CPFY 与  $0.05\text{g}/\text{mL}$  的穿心莲作用 4h 生物被膜细菌的存活率降至 2.7%。

### 3 讨论

近年来, 随着抗菌药物不断问世, 感染性疾病的预防有了很大改善。然而一些难治性病例, 尽管应用了药敏试验确定有效的抗菌药物, 也可有短暂的临床缓解, 但感染反复恶化。一些研究者在难治的慢性呼吸道感染、慢性泌尿系感染、骨髓炎、心内膜炎、前列腺炎的病例中, 发现了生物被膜细菌<sup>[3-6]</sup>。

用特氟隆作为附着物因为其具有与插管等塑料制品相似的性质而且具有易切割等优点。实验表明, 经过 1d 培养细菌粘附到特氟隆片表面, 菌体表面光滑, 未形成生物被膜(图 1)。经过 6d 培养粘附于特氟隆片上的细菌产生生物被膜, 菌体表面变得粗糙, 细菌聚集成微菌落并被厚厚的生物被膜所包绕(图 2)。最重要的是只有细菌粘附于异物表面时才能形成生物被膜。细菌粘附异物时产生生物被膜, 这是自然现象。它保护细菌免受抗菌物质如抗菌药物、中性粒细胞等的侵袭<sup>[7]</sup>。

生物被膜细菌具有极强的抗药性, Nickel 证实即使抗铜绿假单胞菌抗菌药物浓度达到 MIC 浓度的 100 倍时, 生物被膜中的细菌仍得以生存<sup>[8]</sup>。我们观察到, 当悬浮菌与 2MIC 的 CPFY 作用 4h, 细菌的存活率降至 0.02%, 而生物被膜细菌的存活率降低缓慢, 4h 仅降至 41%(图 3), 差异显著( $P < 0.01$ )。说明生物被膜内细菌对 2MIC 的 CPFY 有抗药性。生物被膜是包绕于细菌微菌落表面的一种多糖蛋白复合物, 它是由一种或多种单糖杂聚组成, 主要是成分是己糖。生物被膜处于类凝胶状态, 可保护细菌免受抗菌药物的作用, 因此生物被膜细菌很难清除<sup>[9]</sup>。生物被膜是难治性感染的重要原因之一。

寻找消除生物被膜的方法是突破难治性感染治疗的一个关键问题。本实验联合应用 CPFY 与 CAM 4h 后生物被膜细菌的存活率降至 0.2%。联合应用 CPFY 与 ROX 4h 后生物被膜细菌的存活率降至 0.5%。CAM 及 ROX 是新型大环内酯类药物, 对铜绿假单胞菌几乎没有杀菌作用( $\text{MIC} > 200\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 实验结果表明: CPFY 分别与 CAM、ROX 联合应用恢复了 CPFY 对生物被膜铜绿假单胞菌的杀菌作用。Yasuda. Hiroshi 报告用 CAM 作用细菌生物被膜 5d 后膜状结构消失, 用藻酸盐和己糖定量分析来测定生物被膜内外多糖的数量, CAM 可减少生物被膜的藻酸盐和己糖, 从而减少多糖<sup>[10]</sup>。目前 CAM、ROX 对生物被膜细菌的清除机制尚不清楚。联合应用 CPFY 与穿心莲 4h 后生物被膜细菌的存活率降至 2.7%。实验表明穿心莲对铜绿假单胞菌几乎无杀菌作用, 而联合应用恢复了环丙氟哌酸对生物被膜铜绿假单胞菌的杀菌作用。揭示中药穿心莲有清除生物被

膜的作用。联合应用铜绿假单胞菌的杀菌药物如 CFX 和清除生物被膜的药如 CAM, ROX, 中药穿心莲, 有可能提高由铜绿假单胞菌引起的难治性感染的治疗效果, 尚需进一步研究加以证实。

**致谢** 中国医科大学中心电镜室李家斌及苏越平二位老师给予的电镜技术支持。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Costerton J W, Gressey G G, Cheng K J. *Stick. Sci Am*, 1978, 238: 86.
- [ 2 ] 戴自英主编. 临床抗菌药理学. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 377.
- [ 3 ] Ohgaki N. 感染症学杂志, 1994, 68(1): 138.
- [ 4 ] Marrie T J, Costerton J W. *J Clin Microbiol*, 1985, 22: 924.
- [ 5 ] Mills J, Pulliam J, Dull L, et al. *Infect Immun*, 1984, 43: 359.
- [ 6 ] Brown M R, Williams W W. *Ann Rev Microbiol*, 1985, 39: 527.
- [ 7 ] Caldwell D E, Korke D R, Lawrence J R. *J Appl Bacterio*, 1993, 74: 52.
- [ 8 ] Nickel J C, Ruseka J B, Costerton J W. *Anti Microb Chemo*, 1985, 27: 619.
- [ 9 ] Costerton J W, Irvin R T, Cheng K J. *Ann Rev Microbiol*, 1981, 35: 299.
- [ 10 ] Yasuda H. *Agent Chemother*, 1993, 37: 1749.

## INTERACTION BETWEEN BIOFILM FORMED BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND ANTIBACTERIAL AGENTS

Feng Xinghou<sup>1</sup> Zhao Guangfu<sup>1</sup> Cui Liandong<sup>2</sup> Guan Xin<sup>3</sup> Wang Hongda<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Department of Respiratory, Liaoning Provincial Hospital, Shenyang 110015)

(<sup>2</sup> Department of Laboratory Science, Liaoning Provincial Hospital, Shenyang 110015)

(<sup>3</sup> Department of Respiratory, Chinese Medical University, Shenyang 110001)

**Abstract:** We hypothesized that bacterial biofilm formation could be an important factor that make some infection intractable. Interaction of *P. aeruginosa* biofilm with antibacterial agents was examined in vitro. Methods: *P. aeruginosa* incubated for 6 days in a saline-teflon system formed biofilm on the surfaces of the teflon piece. The biofilm were characterized by dense colonization of bacteria and thick membranous structure that covered the colonies, it was observed with a scanning electron microscopy. CFX, CAM, ROX and Herba Andrographitis were added to the biofilm bacteria. Results: The rate of survival of the floating bacteria decreased to 0.02% after 4 hours of contact with 2MIC of Ciprofloxacin (CFX), but that of biofilms was 41%. When 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Clarithromycin (CAM) per mL was combined with CFX, the survival rate for the biofilm bacteria decreased to 0.2%. When 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Roxithromycin (ROX) was combined with CFX, the survival rate for the biofilm bacteria decreased to 0.5%. When 0.05g of Burm. f. per mL was combined with CFX the survival rate for the biofilm bacteria decreased to 2.7%. Conclusion: We conclude that biofilm bacteria are much more resistant to CFX than the floating bacteria. the combination of CFX and CAM, ROX HA were more effective in decreasing the biofilm bacteria survival rate than CFX alone. The results suggest that the combination of CFX and CAM, ROX, HA can be one of the therapeutic maneuvers against biofilm bacteria.

**Key words:** Bacteria biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibacterial agent