



抗微生物肽 CRAMP 联合抗生素分散铜绿假单胞菌生物被膜的增效作用研究

熊静^{1,2}, 王士源^{1,2}, 李会^{1,2}, 张阳^{1,2}, 程鹏^{1,2}, 梅翠^{1,2}, 彭练慈^{1,2,3}, 徐登峰⁴,
高继业^{1,2,3}, 何玉张¹, 陈红伟^{1,2,3*}

- 1 西南大学动物医学院, 重庆 402460
- 2 西南大学医学研究院免疫学研究中心, 重庆 402460
- 3 国家生猪技术创新中心, 重庆 402460
- 4 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460

熊静, 王士源, 李会, 张阳, 程鹏, 梅翠, 彭练慈, 徐登峰, 高继业, 何玉张, 陈红伟. 抗微生物肽 CRAMP 联合抗生素分散铜绿假单胞菌生物被膜的增效作用研究. 微生物学报, 2022, 62(8): 3251–3262.

Xiong Jing, Wang Shiyuan, Li Hui, Zhang Yang, Cheng Peng, Mei Cui, Peng Lianci, Xu Dengfeng, Gao Jiye, He Yuzhang, Chen Hongwei. Synergistic effect of CRAMP and antibiotic against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3251–3262.

摘要:【目的】研究修饰后的鼠源抗微生物肽 CRAMP 联用抗生素对铜绿假单胞菌 PAO1 成熟生物被膜的分散作用, 为临床联合应用抗生物被膜药物提供理论依据。【方法】采用微量肉汤稀释法测定 CRAMP 修饰肽和抗生素对 PAO1 的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)和生物被膜最小根除浓度(MBEC); 采用时间杀菌曲线(time-kill curve, TKC)法测定 CRAMP 修饰肽及抗生素单用和联用对 PAO1 成熟生物被膜的杀菌活性; 采用菌落计数法和激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)评估 CRAMP 修饰肽联用抗生素对 PAO1 成熟生物被膜的分散作用。【结果】与单用抗生素组相比, 除 2 种碳青霉烯类药物和 4 种 β -内酰胺类药物, 其他抗生素联合 CRAMP 修饰肽后的 MBEC 值均有不同程度的下降, 万古霉素、罗红霉素和阿奇霉素下降倍数最明显(4 倍)。TKC 试

基金项目: 重庆市研究生科研创新项目(CYS21134); 国家自然科学基金(32102684); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2019B040, SWU120057); 重庆荣昌农牧高新技术产业研发专项(cstc2019ngzx0014); 重庆市高等教育教学改革项目(213059)

Supported by the Graduate Research and Innovation Projects of Chongqing (CYS21134), by the National Natural Science Foundation of China (32102684), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2019B040, SWU120057), by the Chongqing Rongchang Agricultural and Animal Husbandry High-Tech Industry Research and Development Project (cstc2019ngzx0014) and by the Chongqing Higher Education Teaching Reform Project (213059)

*Corresponding author. E-mail: dyxchw@swu.edu.cn

Received: 24 December 2021; Revised: 15 March 2022; Published online: 21 April 2022

验结果表明, CRAMP 修饰肽分别联用万古霉素、罗红霉素和阿奇霉素均具有比单用药更快且更强的杀菌作用, 尤其是与万古霉素联用仅在 3 h 时杀灭了全部(100%)的生物被膜细菌。随后, 通过 CLSM 观察发现生物被膜数量、体积、面积和单位面积荧光强度均有明显的变化。【结论】CRAMP 修饰肽对铜绿假单胞菌 PAO1 成熟生物被膜具有分散作用, 与万古霉素联用具有明显协同增效作用, 且作用 PAO1 成熟生物被膜 1 h 时协同效应最大。

关键词: 铜绿假单胞菌; 生物被膜; 抗微生物肽; 万古霉素; 分散作用

Synergistic effect of CRAMP and antibiotic against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

XIONG Jing^{1,2}, WANG Shiyuan^{1,2}, LI Hui^{1,2}, ZHANG Yang^{1,2}, CHENG Peng^{1,2}, MEI Cui^{1,2}, PENG Lianci^{1,2,3}, XU Dengfeng⁴, GAO Jiye^{1,2,3}, HE Yuzhang¹, CHEN Hongwei^{1,2,3*}

1 College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China

2 Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, Chongqing 402460, China

3 National Center of Technology Innovation for Pigs, Chongqing 402460, China

4 Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China

Abstract: [Objective] To investigate the effect of modified mouse cathelicidin related antimicrobial peptide (CRAMP) combined with antibiotics against the mature biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and thereby lay a theoretical basis for the combined application of anti-biofilm drugs. [Methods] Broth microdilution was employed for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) of CRAMP and antibiotics on PAO1. The time-kill curve (TKC) method was used to determine the bactericidal activities of CRAMP alone, antibiotics alone, and the combination of CRAMP and antibiotics against the mature biofilm of PAO1. Colony counting method and confocal laser scanning microscope (CLSM) were applied to evaluate the dispersal effect of CRAMP combined with antibiotics on the biofilm. [Results] Compared with the antibiotics alone, the combination of antibiotics (except for two carbapenems and four β -lactam antibiotics) with CRAMP recorded the decrease in MBEC, particularly vancomycin, roxithromycin, and azithromycin (1/4 that of antibiotics alone). According to the TKC, the combination of vancomycin, roxithromycin, and azithromycin with CRAMP showed faster and stronger bactericidal activity than antibiotics alone, especially the combination of vancomycin which killed all (100%) biofilm bacteria in 3 h. Under CLSM, the number, volume, area, and fluorescence intensity per unit area of biofilm were significantly changed. [Conclusion] CRAMP can disperse the mature biofilm of PAO1 and has synergistic effect with vancomycin, and the synergistic effect is the most significant at 1 h.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; antimicrobial peptide; vancomycin; dispersion

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P.a.*), 是一种重要的人畜共患条件性致病菌, 是人类条件性感染的前三大病原菌之一^[1], 因其极易形成生物被膜, 常常被作为研究生物被膜

的模式菌株^[2]。细菌生物被膜(biofilm, BF)是指附着于生物或非生物表面被细菌胞外多糖(exopolysaccharides, EPS, 包含胞外多糖、蛋白质和 eDNA)包裹的有组织的细菌群体^[3]。据统计, 自然界中超过 99%的细菌以生物被膜的形式存在^[4], 80%的院内病原菌感染都与生物被膜有关^[5]。生物被膜细菌常常能够导致比浮游细菌高 10–1 000 倍的抗生素耐药^[6–7]。目前可以通过抑制生物被膜的形成和清除已经形成的成熟生物被膜 2 种途径来消灭生物被膜^[8]。相较于生物被膜的形成, 细菌从成熟生物被膜中分散的机制直到最近才引起人们的重视^[9]。

抗微生物肽(antimicrobial peptide, AMP) 又称抗菌肽或宿主防御肽, 是一类广泛存在于各种生物体内的防御性小肽, 是免疫系统的重要组成部分。在包括小鼠和人类在内的各种哺乳动物中都发现了抗微生物肽, 其中鼠源抗微生物肽(cathelicidin related antimicrobial peptide, CRAMP)和 LL-37 是唯一存在于小鼠和人体内的抗微生物肽^[10]。近年来, 有研究者将 LL-37 应用于对抗细菌生物被膜领域, LL-37 及其修饰物已被报道具有抗生物被膜活性^[11–12], 而 CRAMP 的结构和功能与 LL-37 极为相似^[13]。随着对抗微生物肽的抗菌机理和抗生素的耐药机理的深入研究, 有研究报道抗微生物肽和某些抗生素之间存在协同抗菌作用^[14]。

本研究通过前期试验发现, CRAMP 修饰肽可以抑制铜绿假单胞菌 PAO1 生物被膜的形成和清除成熟生物被膜, 通过激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)发现 CRAMP (62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)修饰肽作用后的 PAO1 生物被膜体积和数量明显变小^[15–16]。初步推测 CRAMP 修饰肽的这种清除作用, 主要是促使 PAO1 成熟生物被膜提前分散, 并主要以分散细菌形式存在。本研究将 CRAMP 修饰肽与 14 种抗生素联合应用

于 PAO1 成熟生物被膜, 旨在根除生物被膜细菌、杀灭分散细菌及浮游细菌, 同时降低药物的使用剂量和延缓细菌耐药性的产生。

1 材料与方法

1.1 菌株和药品

铜绿假单胞菌 PAO1 株, 中国普通微生物菌种保藏管理中心。

CRAMP 修饰肽由苏州强耀生物科技有限公司合成和修饰, 氨基酸序列和修饰见国家发明专利(201810701474.7); 美罗培南(meropenem, MEM)、亚胺培南(imipenem, IMP)、哌拉西林(piperacillin, PIP)、头孢他啶/碳酸钠(ceftazidime with sodium carbonate, CAZ)、头孢喹诺(cefquinome sulfate, CQN)、头孢哌酮酸(cefoperazone acid, CFP)、硫酸阿米卡星(amikacin sulfate, AMK)、阿奇霉素(azithromycin, AZM)、罗红霉素(roxithromycin, ROX)、乳酸环丙沙星(ciprofloxacin lactate, CIP)、盐酸万古霉素(vancomycin hydrochloride, VAN)均购自美仑生物技术有限公司; 硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate, GEN)、多粘菌素 E 硫酸盐(colistin sulfate, COL)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENX)购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

MH 肉汤、LB 肉汤、LB 琼脂、TSA 琼脂均购自青岛海博生物技术有限公司; 1%结晶紫、Triton X-100 购自北京索莱宝科技有限公司; 96 孔细胞培养板(3599)购自康宁公司; Lab-Tek™ II 腔室盖玻片、FilmTracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 CRAMP 修饰肽对 PAO1 成熟生物被膜细菌的影响

将 PAO1 菌株隔夜培养, 10 000 r/min 离心

10 min, 弃上清重悬于等体积 MH 肉汤。调整 $OD_{600}=0.1$, 并稀释 100 倍, 作为工作菌液。将工作菌液加入 96 孔板中, 37 °C 培养 72 h, 形成成熟生物被膜, 每隔 24 h 更换一次 MH 肉汤^[16]。培养完毕后, 用 PBS 溶液洗去浮游菌。将成熟生物被膜分为 Control 组、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组, 加入提前稀释好的药物, 于 37 °C 作用 1 h。作用完毕后, 将孔里上层菌液转移至洁净的 96 孔板中(用于上层细菌活菌计数), 用 PBS 溶液洗涤生物被膜, 再加入 0.1% Triton 溶液洗脱生物被膜细菌(用于生物被膜细菌活菌计数)。将上层细菌与生物被膜细菌 10 倍稀释至合适浓度梯度后涂布于 TSA 琼脂板上, 于 37 °C 静置培养 16–18 h 观察结果。所有试验均独立重复 3 次以上, 下同。

1.4 CRAMP 修饰肽及 14 种抗生素的 MIC 和 MBC 值测定

将 CRAMP 修饰肽与抗生素用无菌水溶解稀释, 然后将药物溶液通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。采用微量肉汤稀释法测定 CRAMP 修饰肽及 14 种抗生素对铜绿假单胞菌 PAO1 的最小抑菌浓度(MIC)。然后通过细菌计数确定药物的 MBC 值。以能使细菌减少 99.9% 的药物浓度作为该药物对铜绿假单胞菌 PAO1 的最小杀菌浓度(MBC)^[17]。

1.5 CRAMP 修饰肽及 14 种抗生素单用和联用的 MBEC 值测定

在 96 孔板中培养 3 d 成熟生物被膜, 然后用 PBS 溶液洗去浮游菌。将 CRAMP 修饰肽和抗生素倍比稀释后加入孔中, 并设置 Control 组, 于 37 °C 静置培养 24 h。作用完毕后, 用 PBS 溶液洗去药物及浮游菌。再加入 0.1% Triton 溶液洗脱生物被膜细菌。将生物被膜细菌 10 倍稀释至合适浓度梯度后涂布于 TSA 琼脂板上, 于 37 °C 静置培养 16–18 h 观察结果。与 Control 组相比, 以用药浓度能够使得铜绿假

单胞菌 PAO1 成熟生物被膜细菌下降 99.9% 作为生物被膜最小根除浓度(MBEC)。

1.6 CRAMP 修饰肽联用万古霉素、罗红霉素和阿奇霉素对 PAO1 生物被膜细菌的 TKC

在 96 孔板中培养 3 d 成熟生物被膜, 然后用 PBS 溶液洗去浮游菌。将成熟生物被膜分为 Control 组、CRAMP 修饰肽组、抗生素组和联合用药组(CRAMP 修饰肽为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、药物为 1 \times MBEC 浓度)分别进行试验。加入提前稀释好的药物, 于 37 °C 分别作用 0、0.5、1、3、6、24 h。作用完毕后, 用 PBS 溶液洗去药物和浮游细菌。再加入 0.1% Triton 溶液洗脱生物被膜细菌。将生物被膜细菌 10 倍稀释至合适浓度梯度后涂布于 TSA 琼脂板上, 于 37 °C 静置培养 16–18 h 观察结果。最后将试验结果以时间变化作为横坐标, 生物被膜细菌存活数量作为纵坐标, 绘制时间杀菌曲线(time killing curve, TKC)。

药物协同效应的判定: 协同作用或拮抗作用定义为药物作用后能使得生物被膜细菌数量与原始生物被膜细菌数量相比减少或增加 2 \log_{10} (CFU/mL) 以上, 若变化范围在 2 \log_{10} (CFU/mL) 以内, 则定义为相加作用^[18]。为了更好地说明哪一个时间点的协同效应更强, 采用了 bliss 公式(1)来辅助判断。若实际抑制率与理论抑制率差值越大, 则说明协同效应越高^[19]。

$$Z=X+Y(1-X) \quad (1)$$

X 值代表两种药物中任何一种药物的生物被膜细菌抑制率, Y 值代表另外一种药物的生物被膜细菌抑制率, Z 值代表 2 种药物联用后产生的理论生物被膜细菌抑制率。

1.7 激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)表征生物被膜形态

将工作菌液加入 Lab-Tek™ II 腔室盖玻片

中。在 37 °C 条件下静置培养 3 d, 每隔 24 h 更换培养基。将成熟生物被膜平均分成 4 个组, 分别为 Control 组、CRAMP 修饰肽组、抗生素组和联合用药组。培养 3 d 后, 弃上清液并用 PBS 溶液洗去浮游细菌, 加入提前稀释好的药物, 于 37 °C 作用 1 h。药物干预结束后, 用 0.9% 的 NaCl 溶液洗去未附着的浮游细菌。在暗室中用 Filmtracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit 染色。用灭菌水洗去多余的染料, 在 Nikon Eclipse Ti2 共聚焦激光显微镜 20 倍镜下观察生物被膜^[16]。激发波长分别为 488 nm (SYTO) 和 561 nm (PI), 针孔大小采用 60 μm。在 20 倍物镜下随机选取视野, 并进行 Z-stack, 每个组至少 3 次独立重复试验的 9 个随机视野, 图像导出处理采用 NIS Viewer v5.21.00 软件处理。生物被膜相关试验参数, 如荧光强度、生物被膜体积、生物被膜面积等均采用开源软件 Biofilm Q^[20] 进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 CRAMP 修饰肽对 PAO1 成熟生物被膜细菌的影响

CRAMP 修饰肽作用于铜绿假单胞菌 PAO1 72 h 成熟生物被膜后, 在 62.5 μg/mL 浓度下, 生物被膜细菌下降 1.76 个 log₁₀ (CFU/mL) 的值, 上层液细菌下降 0.02 个 log₁₀ (CFU/mL) 的值; 在 31.2 μg/mL 浓度下, 生物被膜细菌下降 1.08 个 log₁₀ (CFU/mL) 的值, 上层液细菌增加 1.36 个 log₁₀ (CFU/mL) 的值; 在 15.6 μg/mL 浓度下, 生物被膜细菌下降 0.25 个 log₁₀ (CFU/mL) 的值, 上层液细菌增加 0.17 个 log₁₀ (CFU/mL) 的值。CRAMP 修饰肽各浓度对铜绿假单胞菌 PAO1 72 h 成熟生物被膜细菌和上层液细菌的作用具体情况详见图 1。

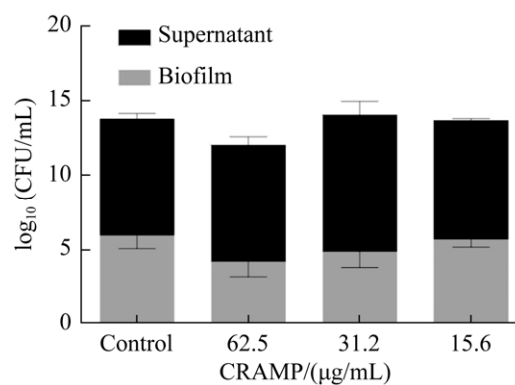


图 1 CRAMP 对 PAO1 成熟生物被膜细菌的影响

Figure 1 Effects of CRAMP on PAO1 mature biofilm bacteria. The black color represents the number of dispersal cells in the upper suspension, the gray color represents the number of biofilm cells. The error bar represents the standard deviation of at least three independent repeats of data at the same point in time.

2.2 CRAMP 修饰肽及 14 种抗生素的 MIC、MBC、MBEC 值和 CRAMP 修饰肽联合 14 种抗生素的 MBEC 值

CRAMP 修饰肽作用于铜绿假单胞菌 PAO1 72 h 成熟生物被膜后 MBEC 值大于 5 000 μg/mL。2 种碳青霉烯类药物(美罗培南和亚胺培南)和 4 种 β-内酰胺类药物(哌拉西林、头孢他啶、头孢喹诺和头孢哌酮)对铜绿假单胞菌 PAO1 72 h 成熟生物被膜的 MBEC 值均大于 2 048 μg/mL。阿奇霉素、罗红霉素、万古霉素和多粘菌素 E 对铜绿假单胞菌 PAO1 成熟生物被膜的 MBEC 值分别为 16、512、128 和 1 024 μg/mL, 其他大多数抗生素的 MBEC 值均 ≤ 2 μg/mL。

CRAMP 修饰肽联合 2 种碳青霉烯类药物(美罗培南和亚胺培南)和 4 种 β-内酰胺类药物(哌拉西林、头孢他啶、头孢喹诺和头孢哌酮)后对铜绿假单胞菌 PAO1 72 h 成熟生物被膜的 MBEC 值仍大于 2 048 μg/mL。其他抗生素相较于单用药物的 MBEC 值, 联合 CRAMP 修饰肽

后的 MBEC 值药物使用浓度均有不同程度的下降。万古霉素、罗红霉素和阿奇霉素下降倍数最明显(4 倍)。各个药物对 PAO1 的 MIC、MBC、MBEC 值和 CRAMP 修饰肽联合 14 种抗生素的 MBEC 值, 结果详见表 1。

2.3 CRAMP 修饰肽联用万古霉素等对 PAO1 生物被膜细菌的 TKC

对照组在前 6 h 内生物被膜细菌数量上升了 2.60 (99.75%)个 \log_{10} (CFU/mL) 的值。但与 6 h 相比, 生物被膜细菌数量在 24 h 略有减少(仅上升 1.77 个 \log_{10} (CFU/mL) 的值, 约 98.30%)。CRAMP 修饰肽组 3 h 时能够减少 1.41 个 \log_{10} (CFU/mL) (96.11%) 的生物被膜细菌, 3 h

后生物被膜细菌数量逐渐增多。3 种抗生素单用组药物使用后均能使得生物被膜细菌数量有着不同的下降。万古霉素组在 6 h 时能够杀灭全部(100%)的生物被膜细菌, 罗红霉素在 24 h 时能够杀灭全部(100%)的生物被膜细菌, 阿奇霉素在 24 h 时也能使生物被膜细菌数量下降 3.14 (99.93%)个 \log_{10} (CFU/mL) 的值。而联用 CRAMP 修饰肽后, 万古霉素组仅 3 h 时就能够杀灭全部(100%)的生物被膜细菌, 罗红霉素和阿奇霉素在相同时间点杀灭生物被膜细菌的数量都有提高。CRAMP 修饰肽联用万古霉素、罗红霉素、阿奇霉素各个时间点生物被膜细菌数量见图 2。

表 1 CRAMP 和抗生素对 PAO1 的体外抗菌和抗生物被膜活性

Table 1 *In vitro* antibacterial and anti-biofilm activities of CRAMP and antibiotics against PAO1

Antimicrobial agents	MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MBC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MBEC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MBEC(AMP+antibiotic)/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Fold change
CRAMP	15.625	31.25	>5 000	—	—
MEM	0.5	2	>2 048	>2 048	—
IMP	2	8	>2 048	>2 048	—
PIP	2	4	>2 048	>2 048	—
CAZ	1	2	>2 048	>2 048	—
CQN	2	2	>2 048	>2 048	—
CFP	4	4	>2 048	>2 048	—
GEN	0.5	1	2	1	2 \times
AMK	0.25	0.5	1	0.5	2 \times
AZM	16	16	16	4	4 \times
ROX	512	512	512	128	4 \times
CIP	0.031	0.063	0.125	0.125	1 \times
ENX	0.5	1	1–2	1–2	1 \times
COL	0.25	0.5	128	64	2 \times
VAN	1 024	1 024	1 024	256	4 \times

“—” indicates that the MBEC value of the drug has not been measured or there is no significant change in the MBEC value of the drug combined with antimicrobial peptide.

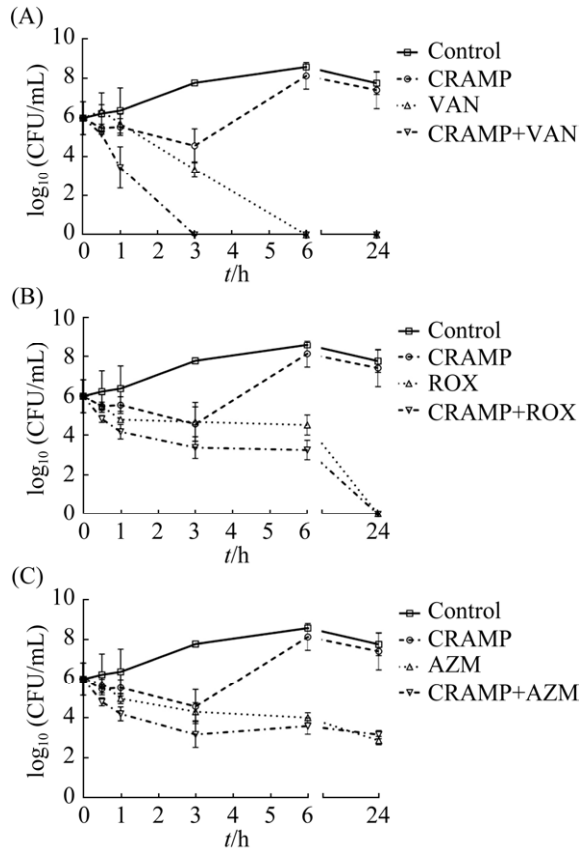


图 2 CRAMP 联用万古霉素、罗红霉素和阿奇霉素对 PAO1 生物被膜细菌的时间杀菌曲线

Figure 2 The time-kill curve of CRAMP combined with vancomycin, roxithromycin and azithromycin against PAO1 biofilm bacteria. VAN: vancomycin (A); ROX: roxithromycin (B); AZM: azithromycin. +CRAMP (C) combinations observed by time-kill determinations against biofilms of PAO1 at $1 \times \text{MBEC}$. The X- and Y-axis represents time and logarithmic PAO1 survival in biofilm, respectively. Error bars indicate the standard deviations between strains. CFU: colony-forming unit, Control: PAO1 biofilms without any antimicrobial treatment. The error bar represents the standard deviation of at least three independent repeats of data at the same point in time.

2.4 CRAMP 修饰肽联用万古霉素等抗 PAO1 生物被膜细菌的协同效应判定

除 CRAMP 修饰肽组, 其余药物干预组在作用铜绿假单胞菌 PAO1 成熟生物被膜 24 h 后生物被膜细菌数量均减少 $3 \log_{10}$ (CFU/mL) 以上。

药物作用 1 h 时, CRAMP 修饰肽与万古霉素联用组生物被膜细菌下降为 $3.46 \log_{10}$ (CFU/mL), CRAMP 修饰肽组与万古霉素单用组生物被膜细菌存活数量分别为 $5.54 \log_{10}$ (CFU/mL) 和 $5.70 \log_{10}$ (CFU/mL)。药物作用 3 h 时, CRAMP 修饰肽与万古霉素联用组生物被膜细菌下降为 0 (CFU/mL), CRAMP 修饰肽组与万古霉素单用组生物被膜细菌存活数量分别为 $4.58 \log_{10}$ (CFU/mL) 和 $3.36 \log_{10}$ (CFU/mL)。在 1 h 和 3 h 时, 万古霉素联用药物组比单药组生物被膜细菌均减少 $2 \log_{10}$ (CFU/mL) 以上, 判定为协同作用。而 CRAMP 修饰肽与罗红霉素和阿奇霉素联用后, 铜绿假单胞菌 PAO1 成熟生物被膜细菌下降量均大于单用药物组, 但无论在哪个时间点, 变化幅度均在 $2 \log_{10}$ (CFU/mL) 以内, 判定为相加作用。

2.5 CRAMP 修饰肽联用万古霉素的协同效应系数计算

CRAMP 修饰肽联用万古霉素作用 PAO1 成熟生物被膜 1、3 h 均下降 $2 \log_{10}$ (CFU/mL) 以上。根据 bliss 公式, CRAMP 修饰肽与万古霉素单用、联用生物被膜细菌理论、实际抑制率(%)详见表 2。结果表明, CRAMP 修饰肽联用万古霉素作用 PAO1 成熟生物被膜 1 h 时协同效应最大。

表 2 CRAMP 联用万古霉素协同效应系数的判断

Table 2 Evaluation of synergistic effect coefficient of CRAMP combined with vancomycin

t/h	Z'	CRAMP	VAN	Z	Z'-Z
1	99.70	48.71	81.80	81.80	17.90
3	100.00	96.11	99.77	99.99	0.01

The Z' represented the real inhibition rate of PAO1 biofilm treated by the combination drugs, the Z represented the theoretical inhibition rate of PAO1 biofilm treated by the combination drugs. the value of Z'-Z was used to describe the degree of synergy, the higher the Z'-Z value was, the more pronounced the synergistic effect was.

2.6 共聚焦激光扫描显微镜观察 CRAMP 修饰肽联用万古霉素对 PAO1 成熟生物被膜的影响

本研究利用共聚焦激光扫描显微镜观察了 $1 \times \text{MBEC}$ 浓度下 CRAMP 修饰肽和万古霉素单用、联用对 PAO1 成熟生物被膜的影响, 代表性图片和 Biofilm Q 量化生物被膜分析数据见图 3。

CRAMP 修饰肽联用万古霉素对 PAO1 成熟生物被膜数量和体积的影响, 与 Control 组相比, CRAMP 修饰肽组、联用药物组生物被膜数量分别减少 79.03% 和 85.92%, 差异极显著 ($P < 0.01$); 但是 VAN 组生物被膜数量减少 38.20%, 差异显著 ($P < 0.05$)。CRAMP 修饰肽、VAN 组及联用药物组生物被膜体积分别减少 91.83%、73.38% 和 88.71%, 差异极显著 ($P < 0.01$); 与 VAN 组相比, CRAMP 修饰肽组生物被膜数量和体积分别减少 66.06% 和 69.33%, 差异极显著 ($P < 0.01$); 与万古霉素组相比, 联用组生物被膜数量减少 77.21%, 差异极显著 ($P < 0.01$), 生物被膜体积减小 57.60%, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 3I–3J)。

CRAMP 修饰肽联用万古霉素对 PAO1 成熟生物被膜面积的影响, CRAMP 修饰肽联用万古霉素组与 Control 组相比, 生物被膜面积减少 20.12%, 差异极显著 ($P < 0.01$); 与 CRAMP 修饰肽组相比, 生物被膜面积减少 14.31%, 差异显著 ($P < 0.05$); 与万古霉素组相比, 生物被膜面积减少 17.30%, 差异极显著 ($P < 0.01$) (图 3K)。

CRAMP 修饰肽联用万古霉素对 PAO1 成熟生物被膜单位面积荧光强度的影响, 用药组与 Control 组相比, CRAMP 修饰肽、VAN 组及联用药物组 SYTO9 (染色为绿色, 代表活菌) 单位面积荧光强度分别减少 69.19%、68.04% 和

73.71%, PI (染色为红色, 代表死菌) 单位面积荧光强度分别减少 85.42%、62.17% 和 55.63%, 均差异极显著 ($P < 0.01$); 但是, 与 CRAMP 修饰肽组相比, VAN 组 PI 单位面积荧光强度增加 2.59 倍, 差异显著 ($P < 0.05$), 联用药物组 PI 单位面积荧光强度增加 3.04 倍, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 3L)。

3 讨论与结论

随着抗生素的广泛应用及不合理使用, 细菌耐药性形势变得十分严峻。近年来, 细菌生物被膜由于其高度的抗生素耐药性, 使其受到了越来越多的研究人员关注。本研究考察了 14 种传统抗生素的抗生物被膜能力, 发现大部分抗生素的最小生物被膜根除浓度 (MBEC) 远大于最小杀菌浓度 (MBC), 表明生物被膜细菌较其浮游细菌具有不同程度的抗生素耐药, 这可能与生物被膜 EPS 的成分和抗生素的渗透性相关。另外, 本研究在 CRAMP 修饰肽对 PAO1 成熟生物被膜的分散作用考察中发现, 62.5、31.2 和 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CRAMP 修饰肽均能不同程度降低生物被膜活菌数 (分别减少了 98.3%、91.7% 和 43.8%), 值得注意的是 31.2 和 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度作用下, 上层细菌 (即 72 h 成熟生物被膜的上层培养液中的细菌) 与对照组比较显著增多 (分别增多了 95.6% 和 32.4%), 表明大量生物被膜细菌被分散进入上层培养液中, 而 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用时上层细菌不仅没有增多, 反而降低了, 表明该浓度的 CRAMP 修饰肽对分散细菌也具有明显的抑杀作用。前期我们通过转录组学研究发现, CRAMP 修饰肽可能作用于 PAO1 环二鸟苷酸 (c-di-GMP) 系统, 并且与其密度感应 (quorum sensing, QS) 系统和藻酸盐合成相关^[15–16]。根据文献报道, 低水平的 c-di-GMP 促进细菌运动性, 促使生物被膜细菌向浮游菌转变, 留下中心

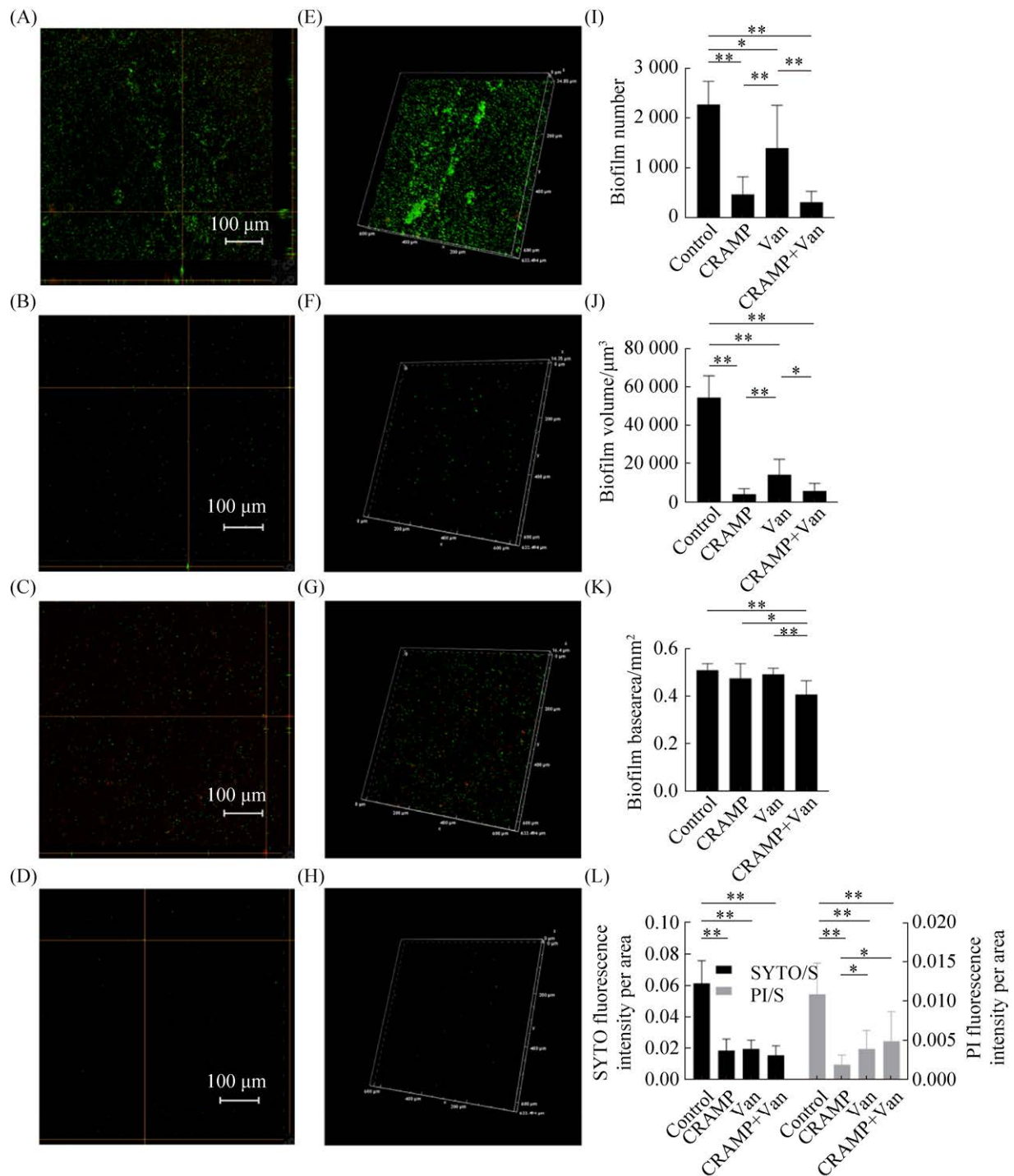


图3 CLSM观察CRAMP联合万古霉素对PAO1成熟生物被膜的影响

Figure 3 Confocal laser scanning microscope observation of CRAMP combined with vancomycin on PAO1 mature biofilm. A (Control), B (CRAMP), C (VAN), D (CRAMP+VAN) are representative orthogonal view; E (Control), F (CRAMP), G (VAN), H (CRAMP+VAN) are representative 3D biofilms; I: the number of biofilms, J: biofilm volume, K: biofilm area, L: fluorescence intensity per unit area (fluorescence intensity/area) were analyzed by Biofilm Q. Significant differences were indicated as *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

空洞的生物被膜，最终导致生物被膜分散^[9]。结合近期我们的研究发现，CRAMP 修饰肽可显著减低 PAO1 成熟生物被膜的 c-di-GMP 水平(另文发表)，表明 CRAMP 修饰肽对 PAO1 成熟生物被膜的清除作用实质是一种分散作用。但生物被膜的分散并不是一劳永逸的，在无抗生素治疗的小鼠伤口模型中，利用糖苷水解酶分散生物被膜时，引起了小鼠体内大规模的细菌扩散和败血症。而辅助抗生素治疗时，小鼠的存活率及生物被膜根除率得到显著的提升^[9,21]。上述研究结果表明，对已经成熟的生物被膜提前且彻底地分散，并对释放出的细菌进行杀灭，将是一种非常有前途的控制生物被膜感染的策略^[9]。

抗微生物肽作为一类具有独特的作用机制的阳离子型多肽，能与两亲性脂质膜融合形成孔洞使得细菌外膜通透性发生改变^[22]。近年来，研究者还将抗微生物肽广泛应用于抗生物被膜研究中^[11-12,16]，发现抗微生物肽不仅在细胞外膜上起作用，还可能在细胞内的转录和翻译等过程发挥作用^[23]。但是，血浆半衰期较短、溶血性和细胞毒性是抗微生物肽难以广泛应用于临床的局限所在。研究者们通过筛选、改造和合成等多种手段希望能够解决这一瓶颈问题，但往往收效甚微且研发时间周期较长，因此在已有基础药物上的合理联合用药成为解决这一问题的关键^[24]。Dosler 等利用抗微生物肽联用抗生素时对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌均有不同程度的协同或相加作用^[18,25]。Paduszynska 等利用短的脂肽和庆大霉素联用发现其能够增强庆大霉素对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌生物被膜细菌的抗菌活性^[26]。本研究也具有类似的发现，CRAMP 修饰肽联合抗生素后能够使得抗生素的 MBEC 值下降 2-4 倍。我们发现远低于 MBEC 浓度条件下，CRAMP 修饰肽

与万古霉素的联用，不仅比万古霉素单用药浓度更低，且杀灭生物被膜细菌速度更快。

考虑到联合用药分级抑制浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FIC 值)测定方法中需要以不同浓度梯度的 CRAMP 修饰肽与不同浓度梯度的抗生素两两分别联合，这将会使得细菌计数工作量陡然上升，再加上不同抗生素的联用组合，对于药物筛选来讲这几乎是一个不可能完成的任务。因此在联合用药时，我们选择了前期试验中可以使得生物被膜分散的浓度(62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。联合用药时通过固定 CRAMP 修饰肽为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (前期试验发现能够清除成熟生物被膜的浓度^[16])与不同浓度抗生素联用的办法进行 MBEC 试验。虽然 MIC 和 MBEC 证明了抗生素和 CRAMP 修饰肽对铜绿假单胞菌 PAO1 有一定的杀菌和抗生物被膜作用，但不能提供关于抗菌活性作用过程的信息。使用 TKC 研究可以克服这一局限性^[18,25]。本研究选择了联合用药后 MBEC 下降最明显的 3 种药物(万古霉素、罗红霉素和阿奇霉素)进行时间杀菌测试。结果显示，CRAMP 修饰肽联用万古霉素显示出协同作用，而与红霉素和阿奇霉素联用显示出相加作用。这与文献报道的外膜渗透性增强剂 PEG-DG 偶联物可以提高低渗透性抗生素万古霉素和红霉素对铜绿假单胞菌 PAO1 的抗菌活性类似^[27]。推测可能是由于 CRAMP 修饰肽属于阳离子型多肽，通过提高 PAO1 外膜的通透性，使得万古霉素能够更好渗透，有利于更好地根除生物被膜细菌。有研究者指出^[27]，革兰氏阴性细菌因其外膜的不对称磷脂和脂多糖结构，这是革兰氏阴性细菌对大型支架抗生素(万古霉素、罗红霉素等)产生天然耐药的原因之一。而铜绿假单胞菌的外膜渗透性比大肠杆菌低约 12 倍，很多临床多重耐药细菌(multi-drug resistance, MDR)也已被证明与外膜通透性结构

改变相关^[27-28]。我们不仅在对生物被膜细菌的作用中观察到 CRAMP 修饰肽与万古霉素的协同作用, 在针对浮游菌的 FIC 值测定中也观察到了明显的协同效应(数据未呈现)。因此, 在新型抗生素开发周期较长的当下, 如何提高已有抗生素的利用度, 克服传统抗生素的应用局限是一个值得深入研究的课题。

综上所述, CRAMP 修饰肽对铜绿假单胞菌成熟生物被膜具有分散作用, 联用万古霉素后的这种分散作用具有明显的协同效应, 且联用后可杀灭生物被膜细菌和分散细菌。提示在防治生物被膜引起的慢性感染中, 有效的生物被膜分散剂联用抗生素不仅有望解决生物被膜感染难以治愈的问题, 而且能有效降低药物的使用剂量、减轻药物的毒副作用、延缓耐药性的产生。总之, CRAMP 修饰肽有望开发成为新型抗生素增效剂, 即生物被膜分散剂, 将为生物被膜感染提供新的防治策略。

参考文献

- [1] 王帅涛, 高倩倩, 成娟丽, 林金水. 铜绿假单胞菌生物被膜组成及其受群体感应系统和 c-di-GMP 调控的研究进展. 微生物学报, 2021, 61(5): 1106-1122.
Wang ST, Gao QQ, Cheng JL, Lin JS. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by quorum sensing systems and c-di-GMP. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(5): 1106-1122. (in Chinese)
- [2] Reichhardt C, Parsek MR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 677.
- [3] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [4] 阴银燕, 何凯明, 吴梦星, 周悦, 史艺, 秦涛. 细菌生物被膜拮抗剂的研究进展. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(10): 1162-1165.
Yin YY, He KM, Wu MX, Zhou Y, Shi Y, Qin T. New advances in antibiofilm agents. *Journal of Pathogen Biology*, 2018, 13(10): 1162-1165. (in Chinese)
- [5] Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, Vasicek EM, Sandala JL, Gunn JS, McLachlan JB. *Salmonella* biofilm formation, chronic infection, and immunity within the intestine and hepatobiliary tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 10: 624622.
- [6] Jacques M, Aragon V, Tremblay YDN. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews*, 2010, 11(2): 97-121.
- [7] Haney EF, Trimble MJ, Cheng JT, Vallé Q, Hancock REW. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules*, 2018, 8(2): 29.
- [8] 王馨, 陈菲, 王龙, 谢鲲鹏, 谢明杰. 地榆对 MRSA 生物被膜形成的抑制作用. 中国生化药物杂志, 2016, 36(9): 27-29.
Wang X, Chen F, Wang L, Xie KP, Xie MJ. Inhibitory effects of *Sanguisorba officinalis* L. on MRSA biofilms formation. *Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics*, 2016, 36(9): 27-29. (in Chinese)
- [9] Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(10): 571-586.
- [10] Kang MJ, Jang AR, Park JY, Ahn JH, Lee TS, Kim DY, Jung DH, Song EJ, Hong JJ, Park JH. Cathelicidin-related antimicrobial peptide contributes to host immune responses against pulmonary infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Immune Network*, 2020, 20(3): e25.
- [11] Wang GS, Mishra B, Epanand RF, Epanand RM. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Biomembranes*, 2014, 1838(9): 2160-2172.
- [12] Mwangi J, Yin YZ, Wang G, Yang M, Li Y, Zhang ZY, Lai R. The antimicrobial peptide ZY4 combats multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infection. *PNAS*, 2019, 116(52): 26516-26522.
- [13] 李杨. Cathelicidin 相关抗菌肽(CRAMP)在炎性肠病及哮喘小鼠模型中的免疫调控作用与机制. 北京协和医学院博士学位论文, 2016.
- [14] Lei J, Sun LC, Huang SY, Zhu CH, Li P, He J, MacKey V, Coy DH, He QY. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(7): 3919-3931.
- [15] Zhang Y, He X, Cheng P, Li XF, Wang SY, Xiong J,

- Li H, Wang ZY, Yi HS, Du HX, Liu J, Chen HW. Effects of a novel anti-biofilm peptide CRAMP combined with antibiotics on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 152: 104660.
- [16] 张阳, 程鹏, 熊静, 李晓芬, 李会, 王士源, 彭练慈, 韩玉竹, 刘娟, 陈红伟. 基于 RNA-Seq 技术分析鼠源宿主防御肽对铜绿假单胞菌成熟生物被膜的清除作用. *微生物学报*, 2021, 61(9): 2843–2853.
Zhang Y, Cheng P, Xiong J, Li XF, Li H, Wang SY, Peng LC, Han YZ, Liu J, Chen HW. Eradication effect of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by mouse host defense peptide based on RNA-Seq technology. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(9): 2843–2853. (in Chinese)
- [17] 严一舟, 袁中伟, 何泾正, 戴雨芸, 范维, 尹立子. 百里香酚联合苯唑西林对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)生物被膜的影响. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4205–4218.
Yan YZ, Yuan ZW, He JZ, Dai YY, Fan W, Yin LZ. Effect of thymol combined with oxacillin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm. *Microbiology China*, 2020, 47(12): 4205–4218. (in Chinese)
- [18] Dosler S, Karaaslan E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*, 2014, 62: 32–37.
- [19] Prichard MN, Prichard LE, Shipman C Jr. Strategic design and three-dimensional analysis of antiviral drug combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1993, 37(3): 540–545.
- [20] Hartmann R, Jeckel H, Jelli E, Singh PK, Vaidya S, Bayer M, Rode DKH, Vidakovic L, Díaz-Pascual F, Fong JCN, Dragoš A, Lamprecht O, Thöming JG, Netter N, Häussler S, Nadell CD, Sourjik V, Kovács ÁT, Yildiz FH, Drescher K. Quantitative image analysis of microbial communities with BiofilmQ. *Nature Microbiology*, 2021, 6(2): 151–156.
- [21] Fleming D, Rumbaugh K. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Scientific Reports*, 2018, 8: 10738.
- [22] Losasso V, Hsiao YW, Martelli F, Winn MD, Crain J. Modulation of antimicrobial peptide potency in stressed lipid bilayers. *Physical Review Letters*, 2019, 122(20): 208103. (in Chinese)
- [23] 李云香, 姚倩, 任玫, 杨帆, 邹敏, 张雨西, 林青. 抗菌肽作用机制研究进展. *动物医学进展*, 2019, 40(9): 98–103.
Li YX, Yao Q, Ren M, Yang F, Zou M, Zhang YX, Lin Q. Progress on action mechanisms of antimicrobial peptides. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(9): 98–103. (in Chinese)
- [24] 张阳, 程鹏, 李晓芬, 陈红伟. 抗生物膜肽研究进展. *生物技术通报*, 2021, 37(2): 216–223.
Zhang Y, Cheng P, Li XF, Chen HW. Research progress on anti-biofilm peptides. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(2): 216–223. (in Chinese)
- [25] Dosler S, Mataraci E. *In vitro* pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Peptides*, 2013, 49: 53–58.
- [26] Padaszynska MA, Greber KE, Padaszynski W, Sawicki W, Kamysz W. Activity of temporin A and short lipopeptides combined with gentamicin against biofilm formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics: Basel, Switzerland*, 2020, 9(9): 566.
- [27] Qiao J, Purro M, Liu Z, Xiong MP. Effects of polyethylene glycol-desferrioxamine: gallium conjugates on *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability and vancomycin potentiation. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, 18(2): 735–742.
- [28] Bolla JM, Alibert-Franco S, Handzlik J, Chevalier J, Mahamoud A, Boyer G, Kieć-Kononowicz K, Pagès JM. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 2011, 585(11): 1682–1690.

(本文责编 张晓丽)