

原子力显微镜观测血卟啉单甲醚对细菌光动力杀伤作用

金花¹, 赵宏霞^{1,2}, 任雅清³, 吴扬哲¹, 蔡继业^{1*}

(暨南大学, ¹化学系, ³理工学院, 广州 510632)

(² 广东工业大学轻工化工学院, 广州 510090)

摘要:【目的】探讨血卟啉单甲醚 (Hematoporphyrin monomethyl Ether, HMME) 对革兰氏阳性 (G^+)、阴性 (G^-) 菌的光动力杀伤作用。【方法】通过平板菌落计数法和原子力显微镜 (AFM), 观察细菌与 HMME 作用前后形貌的变化。【结论】当 HMME 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 可见光(光功密度为 200 mW/cm^2) 光照 30min 时 90% 以上的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 能被杀死, 无光照时对 *S. aureus* 杀灭效果显著。同等条件下, 无论光照还是无光照, HMME 对大肠杆菌 (*E. coli*) 无明显的杀伤作用。AFM 图像显示, *S. aureus* 细菌表面破坏严重, 完全碎裂成鱼鳞状的片状堆积。对 HMME 作用后的 *E. coli* 扫描可见, 菌体原来光滑的表面变成网格状的裂纹排列。【讨论】HMME 对 G^+ 有明显的光失活效应, 而对 G^- 效果不明显。AFM 的超微图像显示 HMME 对细菌细胞的攻击位点主要在细胞膜上。AFM 为我们研究光敏剂对细菌的光动力损伤作用机制的可视化提供了依据。

关键词: 血卟啉单甲醚; 金黄色葡萄球菌; 大肠杆菌; 光动力杀伤; 原子力显微镜
中图分类号: R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1378-05

APDT (anti-microbial photodynamic therapy) [1] 是基于光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 的概念, 利用光敏剂对细菌的优先聚集特性, 在适当波长的低剂量可见光激发下, 光敏剂吸收能量, 产生单态氧、自由基等活性氧物质, 活性氧通过氧化作用杀伤靶细胞, 而不伤害周围组织和细胞。目前 PDT 已被世界多国政府批准应用于消化道、呼吸道和体表等肿瘤的治疗, 具有疗效确切、治疗选择性高和损伤少等优点 [2]。上世纪中叶, 抗生素的发现使人们忘记了 APDT, 如今由于化学治疗剂临床应用中出现的药物毒性、过敏和细菌耐药性等问题, 使得人们不断努力寻找新型的抗菌剂, Bertoloni 等于 1984 年发现光动力疗法 (PDT) 可杀灭细菌。APDT 法已经被证明能在体外有效杀灭细菌, 酵母菌, 病毒等 [3], 是一项值得推广的、安全有效的新疗法, 特别是随着细菌耐药性的出现, 这种方法将在细菌、病毒、微小寄生虫等微生物的灭活作用领域越来越

受到人们的关注 [1]。

血卟啉单甲醚 (Hematoporphyrin monomethyl Ether, HMME) 是我国自主研发的新型光敏剂, 化学名称为 3-(或 8-)(1-甲氧基乙基)-8-(或 3-)(1-羟乙基)-次卟啉 IX, 或血卟啉 3-或 8-单甲醚, 是由二种互为位置异构体的单体卟啉的异构体混合物, 其化学组成稳定, 具有避光时间短、单重态氧产量高, 吸收波长较长, 引起正常组织光毒反应的卟啉相对含量低等优点 [4]。HMME 已临床用于鲜红斑痣、肿瘤等疾病的治疗 [4], 目前为止 HMME 在微生物方面的研究还未见报道。

原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM) 作为形态结构表征的有力工具, 因其样品制备简单和亚纳米级的分辨率, 在生物学研究领域发挥着越来越重要的作用 [5]。本文结合细菌的平板菌落计数法对 HMME 作用前后的 *S. aureus* 和 *E. coli* 的光失活效率和原子力显微镜对反应前后形态结构变化进行了观

基金项目: 国家自然科学基金(60578025, 30540420311)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-20-85223569; E-mail: jycai@jnu.edu.cn

作者简介: 金花(1981-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向为生物纳米技术。E-mail: jinhua0413@163.com

收稿日期: 2008-04-26; 修回日期: 2008-06-04

察比较, 实验结果为进一步探讨细菌对药物的敏感性及其相互作用机理提供了可视化依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 购自广州疾病预防控制中心 (CDC); 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 购自广州微生物研究所。

1.1.2 主要试剂和仪器: 血卟啉单甲醚 (Hematoporphyrin monomethyl Ether, HMME) 购自上海红绿光光敏剂研究所有限公司; 其它试剂均为分析纯。75 W 溴钨灯光源购自北京卓立汉光仪器有限公司; 原子力显微镜 (Atomic force microscope, AFM, AutoProbe CP Research 型产品) 购自美国 Thermomicroscopes 公司。

1.2 不同浓度的 HMME 与 *S. aureus* 和 *E. coli* 的作用

取 4.5 mL 的菌悬液, 放入灭菌试管中, 加入不同浓度的光敏剂 0.5 mL, 37°C 避光孵育 30 min, 孵育后的样品进行光照, 即每个试管取出 1 mL 放入石英比色皿中, 将比色皿放在距离 75 W 溴钨灯光源 1 cm 处进行可见光光照, 光源的光功密度为 200 mW/cm², 光照时间 30 min。另外一组孵育 30 min 后不光照直接进行细菌菌落计数实验。

1.3 平板菌落计数^[6]

分别从二组不同浓度的 HMME 的菌悬液中取 100 μL 加入到 900 μL PBS 缓冲液中 1:10 梯度稀释, 再分别取各浓度 100 μL 到制好的细菌计数培养基平板中, 迅速均匀涂布, 室温下在暗室中用溴钨灯光源 (光功密度为 200 mW/cm²) 光照 30 min 后取出进行菌落计数。设计分组分为: 空白对照组; HMME - 菌种试验组 (HMME 浓度分别为 25 μg/mL, 50 μg/mL, 75 μg/mL 和 150 μg/mL)。每个浓度重复 3 次, 取平均值。

1.4 AFM 成像

分别取未加 HMME 的对照菌液和不同浓度的反应菌液少量, 涂布在新剥离的云母片上, 1.5% 的戊二醛固定 5 min。然后用超纯水漂洗, 空气中风干。将制备好的样品固定在 AFM 的载物台上进行扫描观察, 试验采用 100 μm 扫描器, UL20B 硅探针, 力常数为 2.8 N/m, 在轻敲模式 (tapping mode) 下扫描, 所得图像均以 AFM 自带软件 (Proscan Image Processing Software Version 2.1) 进行平滑处理以消除慢扫描方向上的低频噪音。数据的分析与统计均基于 AFM 自带软件, 如表面超微结构的平均粗糙度 (Ra) 等。

2 结果和分析

2.1 HEEM 与 *S. aureus* 作用的 AFM 观察

S. aureus (G⁺), 为圆形或椭圆形, 直径为 0.8 μm ~ 1.5 μm, 高度 400 nm ~ 600 nm (图 1-A), 大小不一,

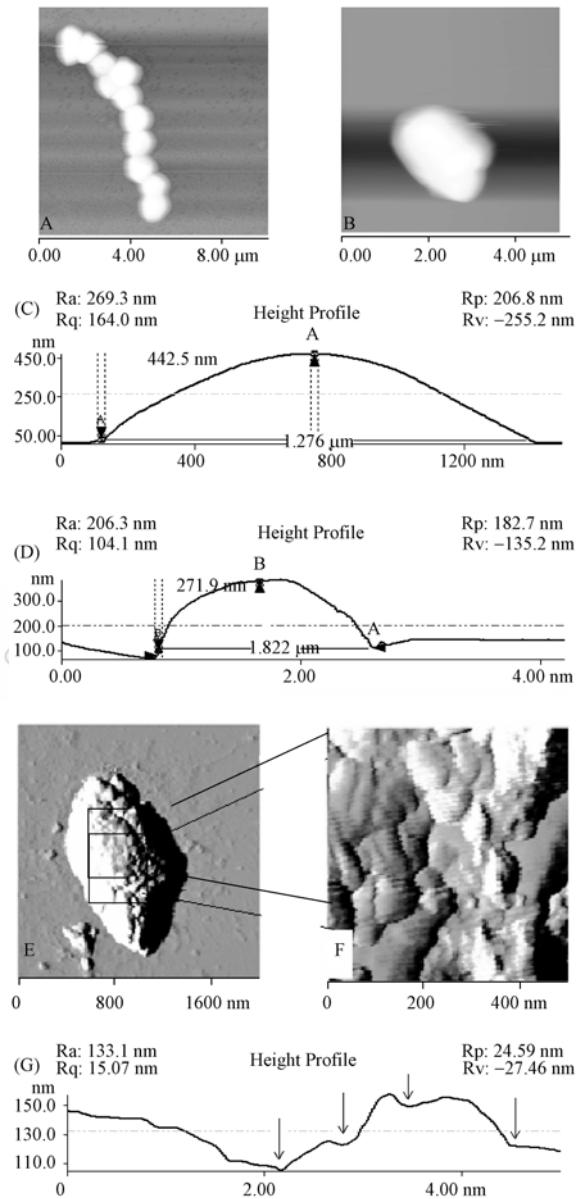


图 1 *S. aureus* 与 HMME 作用前(A)后(B, E)的 AFM 成像
Fig. 1 AFM images of Dose-dependent response of *S. aureus* to HMME irradiated by visible light (power density 200 mW/cm²) for 30 min. Cells were in 0 μg/mL (A), 25 μg/mL HMME (B), 50 μg/mL HMME (E) (Topography mode); Fig C,D,G was the height profiles along lines A, B, F respectively, and F was the enlarged image of square frame in E (error signal mode). With the increasing concentration of HMME, the height and average roughness of the cell were all reduced a lot. The control cells surface was smooth (Fig A,C) and there were many splashes in the surface of the cells reacted with HMME (Fig E,F, black arrows in F showed). Scanning area: A. 10 μm², B. 5 μm², E. 2 μm², F. 500 nm².

无鞭毛、无芽胞，大多数呈聚集状态(图 1-A)，可形成圆形、凸起、边缘整齐，表面光滑、湿润有光泽、不透明的中等大菌落。图 1-B,E 是不同浓度的 HMME 与 *S. aureus* 孵育后光照 30 min 后的 AFM 成像。溴钨灯照射时会产生低热量，会使菌液温度有一定升高，经测量，光照 30 min 后，温度大约升高 5℃ 左右，此温度下，*S. aureus* 不会因热损伤失活。25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HMME 在光照下使 *S. aureus* 细胞形状变的不规则，表面出现了轻微裂痕， R_a 由原来的 $269.3 \pm 13.5 \text{ nm}$ 降至 $206.3 \pm 15.6 \text{ nm}$ ，高度由 $442.5 \pm 22.3 \text{ nm}$ 降为 $271.9 \pm 18.4 \text{ nm}$ 左右，直径由 $1.28 \pm 0.18 \mu\text{m}$ 增大至 $1.82 \pm 0.23 \mu\text{m}$ (图 1-B,D)。HMME 浓度增至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，细菌的形状变得更加不规则，细胞壁完全破裂(图 1-E)，对局部 500 nm 范围扫描显示，细菌表面裂成很多鱼鳞状的片状排列(图 1-F)，图 G 是对应图 F 中的直线产生的表面轮廓像，可以看出细胞壁断裂成很多片(图-G 中黑色箭头所示)菌体周围可看到表面脱落物，未见内容物泄漏(图 1-E)。

2.2 HMME 与 *E.coli* 作用的 AFM 观察

E.coli, G^- ，呈杆状或棒状，长度 $2 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$ ，宽约 $1 \mu\text{m} \sim 1.8 \mu\text{m}$ ，高度 400 nm 左右，菌体上生有长而卷曲的鞭毛，鞭毛宽度约 20 nm 左右(图 2-A)，鞭毛的旋转，推动大肠杆菌在液体中运动。图 2-B 为图 2-A 黑色方框所示的局部超微结构的形貌像及其表面轮廓像。可以看出轮廓像线条光滑，细胞表面颗粒平均高度约 45 nm(图 2-D)。菌液加入 HMME 孵育后计数显示，无论是光照还是无光照，同浓度 HMME 对 *E.coli* 都没有明显的杀伤效果。只有当 HMME 浓度增至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，*E.coli* 才受到一定损伤，光照条件下细菌失活率达到 75%，细菌表面出现损伤，鞭毛脱落，高度和 R_a 都显著下降(E, G)，局部超微扫描显示细胞表面颗粒平均高度为 20 nm(图 2-H)，比对照组降低了约 25 nm，原来光滑的表面布满网格状裂纹(图 2-F)，图 H 是对应图 f 中的直线产生的表面轮廓像，可以看出细胞壁已经裂开(图 2-F 黑色箭头所示)，提示 *E.coli* 的光失活位点是其细胞膜。

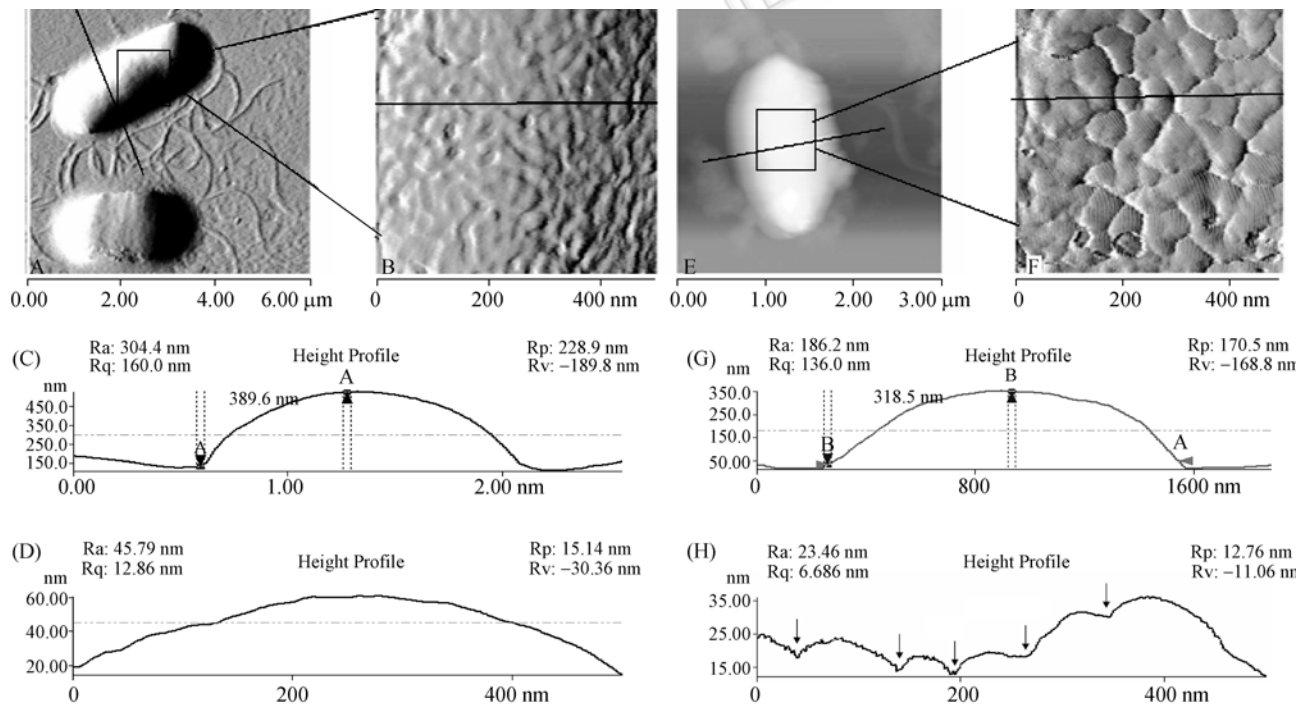


图 2 *E.coli* 与 HMME 作用前(A)后(E)的 AFM 成像

Fig. 2 AFM images of Dose-dependent response of *E.coli* to HMME. Cells were in 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LHMME (A), 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HMME (E); B, F was the ultrastructure image of square frame in A, E; Fig C, D, G, H were the height profiles along the lines in A, B, E, F respectively. The average height of the cell decreased from 389 nm (Fig C) to 318 nm (Fig G) and the cell membrane height decreased from 45 nm (Fig D) to 20 nm (Fig H). The membrane of control cells was smooth (Fig D) and cells reacted with HMME was ruptured into many pieces (black arrows in F showed). Scanning area: A. $6 \mu\text{m}^2$, B, F. 500 nm^2 , E. $3 \mu\text{m}^2$.

3 讨论

PDT 致细胞死亡的分子机理^[1]是光敏剂经适当波长的可见光照射后, 吸收光子的能量, 形成三重态, 三重态的光敏剂可以直接与生物大分子反应产生自由基和/或自由基离子(Ⅰ型反应), 或与分子氧产生单线态氧(Ⅱ型反应)。各种研究表明, G^+ 和 G^- 对 PDT 抑菌敏感性有所差别^[7,8]。带负电荷的和电中性的光敏剂能有效地抑制 G^+ 的生长, 而对 G^- 效果不明显。这主要是由于 G^- 复杂的细胞壁结构, 对光敏剂形成了一道有效屏障, 屏蔽了光敏剂和细胞膜的结合^[8]。只有光敏剂与膜破坏物质的共同作用下, 才能有效抑制 G^- 的生长^[9]。金黄色葡萄球菌, 大肠杆菌和绿脓杆菌的光灭活都是伴随着细胞超微结构的改变^[9], 如: 使细胞壁结构变得无序等。也有证据表明, 细菌的光动力失活是 DNA 损伤所致^[10]。有文献报道, 卟啉类光敏剂对细胞的光失活效应并不是被细胞吸收, 而是由于液体介质中游离的光敏剂分子的光敏效应^[11]。光照射后, 卟啉首先导致细胞质膜改变, 然后渗透进细胞, 使细胞内膜移位, 继续光照, 就造成了细胞内靶标的光动力损伤。此光学过程主要涉及脂质过氧化, 不饱和甾醇的光降解, 分子水平上是导致了细胞壁上蛋白质的失活^[11]。

HMME 与细菌作用的 AFM 图象显示, HMME 对细菌细胞的破坏主要是其表面结构。随着 HMME 浓度的增加, *S. aureus* 光滑的表面逐渐破裂成鱼鳞样的片状排列, 菌体周围有表面脱落物, 未发现内容物泄漏。HMME 对 *E. coli* 的光失活作用不明显, 但是其超微结构图像仍可看出光失活的细胞表面布满网格状裂纹。说明 G^+ 比 G^- 更易于被 HMME 光动力杀灭, 膜损伤是 HMME 致细菌光动力失活的主要机制。HMME 选择性地滞留于细菌细胞壁和细胞膜上, 激光照射时产生单态氧和其它活性氧直接损伤细菌细胞壁及膜系统, 导致细菌死亡。同样条件下, HMME 与大肠杆菌作用时, 发现当 HMME 浓度增大到 150 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细菌表面才出现一定损伤, 这是由于革兰氏阴性菌复杂的细胞壁结构屏蔽了 HMME 与细胞膜的结合, 从而降低了其杀伤作用^[9]。再次证明 HMME 对细胞的攻击位点主要是其细胞膜。AFM 为我们在形貌学上进一步探讨抗菌剂的杀菌机理提供了可视化的依据。

4 结论和展望

HMME 在光照作用下对 *S. aureus* 表面结构的破

坏较 *E. coli* 严重, AFM 图像显示无论是 G^+ 还是 G^- 在 HMME 的光动力作用下, 都是细菌细胞表面受到严重损伤, 未发现内容物泄漏, 说明膜损伤是 PDT 致细菌死亡的一个主要机制^[11]。AFM 从形貌学上证明了 HMME 的 APDT 机理是选择性的攻击细菌细胞的膜性结构, 为我们研究抗菌剂的杀菌机理提供了一个简便可行的可视化依据。

因为很多病原体、多药耐药株及细菌生物膜等都选择性地聚集多种光敏剂, 易被光动力杀伤, 因此 APDT 将是一种安全、高效, 非常有前景的灭菌方法。而原子力显微镜作为高分辨率的形态结构表征工具, 将为我们探究抗菌剂与细菌的作用机制, 进而开发新型光敏化作用的抑菌剂并且进一步应用于工业生产和临床发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*, 2007, 22: 83-91.
- [2] Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 535-545.
- [3] Wainwright M. Photoantimicrobials - a PACT against resistance and infection. *Drugs of the Future*, 2004, 29: 85-93.
- [4] 许德余. 光动力治癌药物的历史、现状、进展、问题和前景. 激光医学杂志(*Journal of Laser Medicine & Surgery*), 2001, 10 (1): 44-47.
- [5] Parot IP, Dufrene YF, Hinterdorfer P, et al. Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *J Mol Recognit*, 2007, 20: 418-431.
- [6] 郑瑜谦, 闫福华, 陈锦灿, 等. 一种新型光敏剂对牙周致病菌的体外抗菌研究. 口腔医学研究(*Journal of Oral Science Research*), 2006, 22(4): 368-371.
- [7] Taylor PW, Stapleton PD, Luzio P. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov Today*, 2002, 7: 1086-1091.
- [8] Maisch T, Szeimies RM, Jori G, et al. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci*, 2004, 3: 907-917.
- [9] Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, et al. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol*, 1992, 55: 89-96.
- [10] Menezes S, Capella MA, Caldas LR. Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*, 1990, 5: 505-517.
- [11] Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, et al. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agent Chemother*, 2004, 48: 2000-2006.

Observation of bacteria photodynamic inactivation induced by hematoporphyrin monomethyl ether by atomic force microscope

Hua Jin¹, Hongxia Zhao^{1,2}, Yaqing Ren³, Yangzhe Wu¹, Jiye Cai^{1*}

¹Chemistry Department, ³College of Science and Technology, Jinan University Guangzhou 510632, China)

²Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China)

Abstract: [Objective] To study the photodynamic inactivation of Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* by hematoporphyrin monomethyl ether. [Methods] Bacteria incubated with different concentrations of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) and then irradiated with visual light for 30 minutes, bacteria inactivation efficiency was detected with the reduction of colony unit, and morphological changes were observed with atomic force microscope (AFM). [Results] Results indicated that 90% of *Staphylococcus aureus* was photoinactivated by illumination with visible light for 30 min (power density 200 mW/cm²) in the presence of 50 µg/mL HMME. The bacteria killing efficiency to *Staphylococcus aureus* with light irradiation was much obvious than that in dark at the same concentration of HMME, although without noticeable damage to *E. coli* with illumination or in dark. AFM ultrastructure images showed that the cells surface of photodynamic inactivated bacteria was all damaged seriously without the leakage of cell contents. [Conclusion] We concluded that the attacked sites to bacteria cells by hematoporphyrin monomethyl ether were bacteria membrane structure. Atomic force microscopy provides us a visual technique to study the mechanism of bacteria reacted with photosensitizers.

Keywords: hematoporphyrin monomethyl ether; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; photodynamic therapy; atomic force microscopy

Supported by the National Science Foundation of China(60578025, 30540420311)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85223569; E-mail: jycai@jnu.edu.cn

Received: 26 April 2008/ Revised: 4 June 2008

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问：我想知道我的稿件的处理状态，如何查询？

答：您可以登录网上查稿区，输入您的用户名、密码，即可查询到审稿状态；如果不是太明白远程中获取的信息，您也可以 e-mail 询问，请注意务必要提示稿件编号，编辑部会在收到您的来信的当天或者次日及时给予回复。

问：我想尽早得到审稿结果，或者提前发表，有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法？

答：如上述所言，我们已经告知了本刊处理稿件的程序和大致时间进度。

- (1) 在作者向我刊投稿之前，应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章，并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以，作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部，以便于进行评审。我们的承诺是在 2 个月之内给予答复，5~7 个月之内刊出。
- (2) 如要求提前发表，请在投稿的同时提出书面报告，说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性，经过我刊编委会讨论并通过后，可予提前刊出，无需另加任何费用。

问：我的文章现已审查完毕，并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询，如果文章修改后，再次投递，是否还需要交稿件受理费？是否仍然用原论文编号提交？

答：这要分两种情况，

- (1) 如果你的文章已经被通知“退稿”了，那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理，从程序上来讲和新投稿件是一样的，仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理，请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。
- (2) 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”，则不作为新稿处理，请作者直接将修改稿上传到远程系统中，不再另交稿件受理费。