

细菌生物膜特征及治疗的研究进展

王国旗, 唐佩福

解放军总医院 骨科, 北京 100853

摘要: 细菌生物膜是慢性感染形成和持续存在的关键因素, 其形成过程及组成较为复杂, 目前发现的成分仅有几种, 而很多治疗方法都是清除生物膜的相关成分。本文对细菌生物膜的特征、关键成分和作用, 以及目前细菌生物膜的治疗进展进行综述。

关键词: 细菌; 生物膜; 感染; 治疗方案;

中图分类号: R 641 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2018)02-0168-04 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2018.02.020

网络出版时间: 2018-01-23 16:35 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20180123.1635.002.html>

Characteristics of bacteria biofilms and development of its treatment strategies

WANG Guoqi, TANG Peifu

Department of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: TANG Peifu. Email: pftang301@163.com

Abstract: Nowadays, bacteriabiofilm is recognized as a key factor in forming and persisting of chronic infection. The formation and components of biofilm are complex and only several components are recognized, and many treatment strategies are developed based on these components. In this review, the characteristics, key components and role of bacteria biofilms and the development of its treatment strategies are summarized.

Keywords: bacteria; biofilm; infection; treatment strategy

皮肤软组织感染是世界性难题, 一直备受关注, 尤其是外科创伤所致的皮肤软组织感染以及各种因素导致的慢性创面。而近20年来, 细菌生物膜一直被认为是慢性感染形成及持续存在的关键因素^[1-4]。因此, 要想正确处理细菌感染, 必须深刻认识细菌生物膜。本文对细菌生物膜特征、关键成分, 以及现有的针对生物膜的相关治疗进展进行综述。

1 细菌生物膜的特征

细菌生物膜通常被定义为复杂菌落, 其通过自分泌的方式产生大量的胞外多聚物(extracellular polymeric substances, EPS)^[5-6], 这种显型是细菌栖息的最佳状态, 与那些在实验室里被广泛研究的游离细菌有很大区别^[7]。细菌生物膜的主要成分包括蛋白质、多糖、细胞外DNA(extracellular DNA, eDNA)、水等。生物膜的形成是一个动态发展的过程, 有研究发现细菌在创面24 h即可形成成熟的生物膜^[8]。其形成大致分为3个阶段: 第一阶段为定植期, 也称为黏附期, 单个细菌或者少量细菌黏附在创面表面, 此时细菌可从可逆黏附发展为不可逆黏附, 增殖并且产生大量的胞外基质, eDNA在此阶段中起到重要的辅助作用^[9]; 第二阶段为成熟期, 此阶段形成成熟稳定且具有三维立体结构的生物膜; 第三阶段为播散期, 此阶段细菌在生物膜内

随时可以播散出去, 重新再定植到其他部位。细菌生物膜可以黏附在生命体表面(如上皮细胞等), 也可以黏附在非生命体表面。如果是黏附在生命体表面, 那么这个表面会存在蛋白或宿主细胞, 这些都有可能改变细菌的黏附能力^[10]。此外, 细菌也可以不黏附在物体的表面而形成生物膜, 如铜绿假单胞菌可以在呼吸道黏液内聚集形成生物膜^[11]。

生物膜可以隐蔽在全身的所有部位, 包括牙科陶瓷、鼻腔、泌尿道黏膜、心内膜、内镜表面、骨科内置物以及外科创面, 当其在组织中停留并且未引起免疫防御时即可形成纯粹的共生关系^[12]。之所以说生物膜是慢性感染形成及持续存在的关键因素, 是因为成熟的生物膜不仅可以帮助细菌逃避机体先天性免疫和适应性免疫系统, 还可以阻止外界抗菌物质进入, 进而为细菌提供有利的环境^[7-8]。近些年研究发现生物膜还具有耐药性, 生物膜对抗菌剂的耐受能力可能要比普通游离生物高出1 000倍^[7]。而生物膜成分中的eDNA在耐药中发挥了重要的作用。Chiang等^[13]研究发现eDNA的保护作用可以让铜绿假单胞菌对氨基糖苷类药物产生耐药性。Heidi等^[14]发现eDNA具有抗菌活性, 通过整合阳离子使细胞裂解, 而整合阳离子可以稳定细菌脂多糖和外膜。通过在生物膜形成过程中加入DNA溶解酶发现对于成熟的生物膜或铜绿假单胞菌的黏液型生物膜, DNA溶解酶不能发挥作用^[15]。无论是革兰阴性菌还是革兰阳性菌, eDNA都是其生物膜基质的重要成分之一^[16]。而在铜绿假单胞菌野生型菌株生物膜中, eDNA的产生与群体感应系统(quorum sensing, QS)有关, 而QS系统的调控可以导致细胞的裂解进而为生物膜提供eDNA^[13]。

收稿日期: 2017-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81472112)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81472112)

作者简介: 王国旗, 男, 在读博士。研究方向: 创伤骨科。Email: guoqi71@126.com

通信作者: 唐佩福, 男, 博士, 主任医师, 主任。Email: pftang301@163.com

2 生物膜的观察

生物膜的观察方法分为宏观观察和显微镜观察。宏观上,如果在创面上见到腐肉样的物质,一般会认为有生物膜的存在。此外创面有光泽也可能是有生物膜存在。尽管这些宏观的方法可以初步判断生物膜的存在,但缺少明确的科学依据和标准,可信度并不高。

生物膜的微观学主要依靠染色和显微镜。对创面细菌生物膜基质成分进行染色观察是证实创面生物膜存在的方法之一,如刀豆蛋白A(concanavalin A, ConA)可以与铜绿假单胞菌胞外多糖特异性结合,采用荧光标记的ConA对组织标本进行染色,在荧光显微镜或共聚焦显微镜下即可观察创面铜绿假单胞菌生物膜的存在^[17-18]。肽核酸荧光原位杂交(peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization, PNA-FISH)是一项可以对宿主组织内细菌进行精确定位的分子技术。该技术已经成功应用于慢性创面上不同细菌的区分与定位^[19]。有研究采用FISH技术发现创面细菌多呈低密度或单菌落聚集状态,在多重细菌感染的情况下也是如此^[20]。此外,铜绿假单胞菌在创面上多倾向于独立聚集成群^[21]。而环境中的生物膜或共生生物膜则包含多种细菌,这种差异的原因目前尚不清楚。此外,扫描电镜也是观察细菌生物膜的重要方法之一。电子显微镜观察发现慢性伤口较急性伤口更容易形成生物膜。一项慢性伤口和急性伤口的活检观察显示,慢性伤口中60%有生物膜存在,而急性伤口中仅6%有生物膜存在^[22]。在Li等^[8]的兔耳金黄色葡萄球菌生物膜感染模型中,扫描电镜可以清楚看到金黄色葡萄球菌在急性创面上聚集成葡萄串样,周围伴有大量细胞外基质成分。

3 生物膜的治疗研究

对于治疗生物膜感染创面,最经典也是最常用的方法为外科清创,可有效清除肉眼可见的坏死组织、活性较差的组织、可能存在生物膜的组织,且外科清创可有效清除大部分已存在的成熟生物膜。然而,外科清创并不能将创面生物膜彻底清除,因为创面组织是有限的,外科清创不可能为了清除生物膜而将全部组织清除,一旦生物膜有残留,很快还会播散,再次形成新的生物膜,进而导致创面难以愈合^[23]。

负压创面疗法(negative pressure wound therapy, NPWT)是近20年来国内应用较多的创面治疗方法。2012年Ngo等^[24]首先报道了体外负压可以减少生物膜的厚度,降低生物膜的扩散距离。Phillips等^[25]采用感染的猪皮生物膜作为研究对象,发现NPWT结合不同冲洗液可以有效的清除创面生物膜内的细菌。2016年Wang等^[18]在体外研究中应用刀豆蛋白A染色,荧光显微镜观察发现,与常压环境相比负压环境可以减少生物膜的形成量。在Li等^[8]的NPWT治疗兔耳生物膜感染模型中,金黄色葡萄球菌感染早期应用NPWT治疗可以有效抑制生物膜的形成,但不能清除已经成熟的生物膜。此外,在这个体外实验部分中,作者发现负压环境可以降低金黄色葡萄球菌生物膜中eDNA的总量。因为eDNA在细菌耐药中发挥重要作用,提示负压

作用可能在降低细菌耐药性方面发挥作用。但目前尚缺少这方面的研究和直接证据。负压创面疗法结合冲洗(negative pressure wound therapy instillation, NPWTi)是对NPWT的改进,也是治疗生物膜方法之一^[26]。Phillips等^[25]发现NPWT结合活性抗菌物质的冲洗可以加强NPWT对创面细菌清除的力度,可有效破坏细菌生物膜。

针对胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)的组成和结构进行治疗是近年来兴起的治疗方法。胞外多糖降解酶就是典型代表,如葡萄糖水解酶(葡聚糖酶和非水溶性葡聚糖酶)、dispersin B可破坏口腔致病性生物膜的基质;糖苷水解酶类则被用来降解混合细菌(金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌)感染创面上形成的生物膜^[27-29]。内溶菌酶(噬菌体编码的肽聚糖水解酶)可以通过降解细菌细胞壁中的肽聚糖从而实现生物膜中细菌的破坏^[30]。经过工程化的肽聚糖水解酶可以与不同的抗菌物质结合,进而通过与肽聚糖的不同结合位点结合而实现裂解细菌,这种方法目前特异性地应用于金黄色葡萄球菌^[31],已经被证实可以有效杀灭细菌,清除生物膜。

脱氧核糖核酸酶(DNase)也是一种有效破坏生物膜的物质,无论在体内还是体外,采用DNase I均可以在早期有效破坏细菌生物膜,其机制是分解了生物膜中eDNA成分^[32-33]。目前应用DNase专门针对体内生物膜的研究较少,但是体外研究证实其可以降低阴道加德纳菌黏附阴道黏膜上皮细胞的能力^[34]。

干扰细菌群体感应系统也是治疗生物膜的方法之一。群体感应系统是细菌之间信息交流的重要渠道,很多细菌的毒力因子分泌都需要该系统。因此,QS系统中信号分子抑制剂在生物膜治疗方面受到广泛关注。如一项体外研究发现QS系统自引物(autoinducer)抑制剂可有效抑制细菌的黏附和播散^[35]。I型自诱导肽可以将聚集在钛金属表面的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌解散开,使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对利福平和左氧氟沙星更加敏感^[36]。最近一项研究使用苯甲酰胺-苯丙咪唑衍生物(M64)干扰铜绿假单胞菌喹诺酮信号系统,而该信号系统是调节生物膜形成和毒力因子产生的重要系统^[37]。结果显示,在小鼠的烧伤和肺部感染模型中M64降低了铜绿假单胞菌的毒力和毒性。当与环丙沙星联合应用时还可以明显降低细菌数量,而该实验中未检测到M64对巨噬细胞有毒性作用。

以抗菌肽为代表的肽类抗菌物质是治疗生物膜的另一重要途径。它的主要特点是保守性较高,对细菌和真菌的生物膜均有效^[38-39]。正是基于此,可以采用人工合成的抗菌肽专门针对某一类细菌或真菌。如一项体外实验发现该方法可以将金黄色葡萄球菌从口腔内多种细菌混合而成的生物膜中移除^[40]。抗菌肽还具有靶向活性,可以针对休眠的细菌,这就使得细菌对其产生耐药性的可能性降低。如果抗菌肽与抗生素联合应用效果也会增加,在一个铜绿假单胞菌生物膜感染的无脊髓生物模型中,抗菌肽与抗生素联合应用明显增强了杀菌效果^[41]。

此外,还有专门针对胞外基质的抗体以及核酸结合蛋

白。有研究已经应用单克隆抗体针对铜绿假单胞菌来源的胞外基质中多聚糖成分,而在临床提取的铜绿假单胞菌中可以产生这种多聚糖^[42]。DNA结合蛋白的DNAB II家族可以破坏eDNA结构的完整性^[43]。具有高亲和性的整合宿主因子(integration host factor, IHF)可以特异性地与生物膜中的核酸蛋白结合,并且被广泛应用于动物模型中^[44-45]。

4 结语

随着研究的进展,我们将更加深入地认识创面细菌生物膜,也会尝试出更好的治疗方法。无论是清创、负压创面疗法,还是针对胞外基质的各种降解酶、相关抗体以及结合蛋白,都是治疗生物膜感染的潜在方案,它们可能在未来的生物膜治疗领域发挥重要作用。

参考文献

- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, 284 (5418): 1318-1322.
- Percival SL, Hill KE, Williams DW, et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds [J]. *Wound Repair Regen*, 2012, 20 (5): 647-657.
- Trostrup H, Lerche CJ, Christophersen LJ, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilm hampers murine central wound healing by suppression of vascular epithelial growth factor [J/OL]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iwj.12846/abstract>; jsessionid=E539FE751006D98CE141DCC1728B2C53.f02t02.
- Barshak MB, Durand ML. The role of infection and antibiotics in chronic rhinosinusitis [J]. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2017, 2 (1): 36-42.
- Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, et al. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12 (10): 791-808.
- Koo H, Allan RN, Howlin RP, et al. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15 (12): 740-755.
- Seth AK, Geringer MR, Hong SJ, et al. In vivo modeling of biofilm-infected wounds: a review [J]. *J Surg Res*, 2012, 178 (1): 330-338.
- Li T, Zhang L, Han LI, et al. Early application of negative pressure wound therapy to acute wounds contaminated with Staphylococcus aureus: An effective approach to preventing biofilm formation [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11 (3): 769-776.
- Tang L, Schramm A, Neu TR, et al. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2013, 86 (3): 394-403.
- Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies [J]. *J Intern Med*, 2012, 272 (6): 541-561.
- Mauch RM, Jensen PO, Moser C, et al. Mechanisms of humoral immune response against Pseudomonas aeruginosa biofilm infection in cystic fibrosis [J/OL]. [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569-1993\(17\)30875-5](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569-1993(17)30875-5).
- Kanno E, Toriyabe S, Zhang L, et al. Biofilm formation on rat skin wounds by Pseudomonas aeruginosa carrying the green fluorescent protein gene [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19 (2): 154-156.
- Chiang WC, Nilsson M, Jensen PØ, et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in Pseudomonas aeruginosa biofilms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (5): 2352-2361.
- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms [J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4 (11): e1000213.
- Yang L, Hengzhuang W, Wu H, et al. Polysaccharides serve as scaffold of biofilms formed by mucoid Pseudomonas aeruginosa [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 65 (2): 366-376.
- Cavaliere R, Ball JL, Turnbull L, et al. The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable Hemophilus influenzae biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin [J]. *Microbiologyopen*, 2014, 3 (4): 557-567.
- Watters C, DeLeon K, Trivedi U, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2013, 202 (2): 131-141.
- Wang GQ, Li TT, Li ZR, et al. Effect of Negative Pressure on Proliferation, Virulence Factor Secretion, Biofilm Formation, and Virulence-Regulated Gene Expression of Pseudomonas aeruginosa In Vitro [J/OL]. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/7986234>.
- Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, et al. Nonrandom distribution of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in chronic wounds [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47 (12): 4084-4089.
- Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010, 59 (3): 324-336.
- Kirketerp-Møller K, Jensen PO, Fazli M, et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46 (8): 2717-2722.
- James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds [J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16 (1): 37-44.
- Seth AK, Geringer MR, Gurjala AN, et al. Treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilm-infected wounds with clinical wound care strategies: a quantitative study using an in vivo rabbit ear model [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2012, 129 (2): 262e-274e.
- Ngo QD, Vickery K, Deva AK. The effect of topical negative pressure on wound biofilms using an in vitro wound model [J]. *Wound Repair Regen*, 2012, 20 (1): 83-90.
- Phillips PL, Yang Q, Schultz GS. The effect of negative pressure wound therapy with periodic instillation using antimicrobial solutions on Pseudomonas aeruginosa biofilm on porcine skin explants [J]. *Int Wound J*, 2013, 10 (Suppl 1): 48-55.
- Singh DP, Gowda AU, Chopra K, et al. The Effect of Negative Pressure Wound Therapy With Antiseptic Instillation on Biofilm Formation in a Porcine Model of Infected Spinal Instrumentation [J]. *Wounds*, 2017, 28 (6): 175-180.
- Kaplan JB. Biofilm matrix-degrading enzymes [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1147: 203-213.
- Pleszczyńska M, Wiater A, Janczarek M, et al. (1 → 3) - α -D-Glucan hydrolases in dental biofilm prevention and control: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 79: 761-778.
- Fleming D, Chahin L, Rumbaugh K. Glycoside Hydrolases Degrade Polymicrobial Bacterial Biofilms in Wounds [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61 (2): e01998-16.
- Schmelcher M, Shen Y, Nelson DC, et al. Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70 (5): 1453-1465.
- Becker SC, Roach DR, Chauhan VS, et al. Triple-acting Lytic Enzyme Treatment of Drug-Resistant and Intracellular Staphylococcus aureus [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25063.
- Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL. Extracellular DNA as a target for biofilm control [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 33: 73-80.
- Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, et al. Low levels of β-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation

- in *Staphylococcus aureus* [J]. *MBio*, 2012, 3 (4): e00198–e00112.
- 34 Hymes SR, Randis TM, Sun TY, et al. DNase inhibits *Gardnerella vaginalis* biofilms in vitro and in vivo [J]. *J Infect Dis*, 2013, 207 (10): 1491–1497.
- 35 Anderson JK, Huang JY, Wreden C, et al. Chemorepulsion from the Quorum Signal Autoinducer-2 Promotes *Helicobacter pylori* Biofilm Dispersal [J]. *MBio*, 2015, 6 (4): e00379.
- 36 Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, et al. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material [J]. *J Orthop Res*, 2010, 28 (1): 55–61.
- 37 Starkey M, Lepine F, Maura D, et al. Identification of Anti-virulence Compounds That Disrupt Quorum-Sensing Regulated Acute and Persistent Pathogenicity [J]. *Plos Pathogens*, 2014, 10 (8): e1004321.
- 38 Pletzer D, Coleman SR, Hancock RE. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2016, 33: 35–40.
- 39 Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858 (5): 1044–1060.
- 40 Guo L, McLean JS, Yang Y, et al. Precision-guided antimicrobial peptide as a targeted modulator of human microbial ecology [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112 (24): 7569–7574.
- 41 de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Mansour SC, et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. *Chem Biol*, 2015, 22 (2): 196–205.
- 42 DiGiandomenico A, Warrener P, Hamilton M, et al. Identification of broadly protective human antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl by phenotypic screening [J]. *J Exp Med*, 2012, 209 (7): 1273–1287.
- 43 Goodman SD, Oberfell KP, Jurcisek JA, et al. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins [J]. *Mucosal Immunol*, 2011, 4 (6): 625–637.
- 44 Xiong YQ, Estelles A, Li L, et al. A Human Biofilm-Disrupting Monoclonal Antibody Potentiates Antibiotic Efficacy in Rodent Models of both *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* Infections [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61 (10): e00904–17.
- 45 Payne DE, Boles BR. Emerging interactions between matrix components during biofilm development [J]. *Curr Genet*, 2016, 62 (1): 137–141.