

• 专题笔谈 •

细菌生物被膜相关感染的致病机制及药物治疗

方向群

20世纪70年代, Costerton等提出了细菌生物被膜(bacterial biofilm, BBF)的概念并指出许多细菌以BBF形式广泛存在于自然界中。随着有关BBF的研究不断深入,越来越多的研究表明BBF与感染性疾病有密切的关系,美国疾病控制和预防中心(CDC)的研究结果表明,约65%的感染性疾病与BBF有关^[1]。笔者于90年代起在国内开始了有关于BBF的实验研究,目前有关BBF的基础及临床研究越来越受到重视,现结合国内外研究进展概述如下。

1 细菌生物被膜的致病机制

BBF是细菌产生多聚复合物基质将自身包绕并黏附于无活性物体或活体表面而形成的有一定结构的细菌群体。临床上常见致病菌如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)、大肠埃希氏菌、流感嗜血杆菌等在一定的条件下都可以形成BBF^[2]。一般认为BBF的形成分为5个阶段:(1)细菌附着于物体表面,在此阶段这种作用是可逆的;(2)细菌产生胞外多聚复合物并不可逆地黏附于物体表面;(3)细菌增殖,结构分化,形成具有一定立体结构的早期BBF;(4)BBF结构进一步分化,形成具有复杂结构的成熟BBF;(5)成熟BBF中,一些细菌可以从BBF上释放并向周围播散,其中部分细菌可以形成新的BBF。BBF并非只是一层致密的膜,在BBF内有着相互交通的水通道(water channels),这些通道可以让细菌生长需要的营养物质进入BBF,代谢废物也可以经此排出^[3]。在BBF的形成中细菌产生的多聚复合物基质起到了关键的作用,虽然其组成随着不同的菌种而不同,但也包含有共同的组分,如纤维素、1,6-乙酰葡萄糖胺、与金黄色葡萄球菌生物被膜相关蛋白(biofilm associated protein, BAP)同类的一些表面蛋白^[4]。

BBF中的细菌对抗菌药物高度耐药并可逃避宿主的免疫作用,导致感染迁延不愈,称为细菌生物被膜相关感染(bacterial biofilm-related infection),主要包括生物医学材料相关感染和某些慢性感染性疾病。由于生物医学材料,如气管插管、中心静脉导管、人工关节等广泛应用,生物医学材料相关感染发病率有所增高;某些慢性感染性疾病如细菌性心内膜炎、慢性骨髓炎由于有BBF的存在而导致感染迁延不愈,治疗极为棘手^[5]。BBF相关感染具有以下特点:(1)病灶局部的炎症反应不很强烈,感染有相互转化的静止期和发作期;(2)抗菌药物治疗起初可能有效,但以后治疗常常失败;(3)致病菌主要是来自皮肤和周围环境中的致病菌如PA,金黄色葡萄球菌,表皮葡萄球菌等^[4]。

BBF感染病灶细菌难以清除的原因一般认为包括以下两个方面:(1)BBF对抗菌药物耐药:①抗菌药物不能渗透到BBF的各个区域,亦即BBF的屏障作用。BBF细胞外基质成分一般由多糖、短肽等组成,极性较大,可以吸附相关的抗菌药物。有研究表明,氨基甙类抗菌药物由于有带电荷的氨基侧链,很容易被PA的基质成分所吸附。但对某些抗菌药物来说,情况有所不同,例如四环素可以迅速渗透到大肠埃希氏菌BBF的各个区域,提示屏障作用并不是惟一的机制^[2,7]。②BBF微环境对细菌的影响。位于被膜表层的细菌获取的营养较丰富,代谢较活跃,而位于被膜深层的细菌由于所需营养和氧气获得受限而代谢缓慢,对于作用于快速生长期的 β -内酰胺类抗菌药物就不敏感^[7]。③细菌的表型变异。Drenkard等^[8]从囊性纤维化患者的痰液中分离到了一些菌落粗糙形态较小的PA变异菌株,称之为RSCV菌株(rough small-colony variant),与野生型相比对卡那霉素耐药。有趣的是,体外试验表明,RSCV也更容易形成BBF。进一步的研究发现这些菌株中存在一种表型变异调节因子(phenotype variant regulator, pvrR),如果该因子高表达可以使变异菌株对卡那霉素的耐药性降低,同时细菌也不容易形成BBF。因此,pvrR是一个既能调节细菌耐药又能影响BBF形成的双功能因子,揭示了细菌耐药和BBF形成之间的内在联系^[2,8]。(2)

收稿日期:2007-06-15

作者单位:100853 北京市,解放军总医院呼吸科

作者简介:方向群,男,1967年5月生,浙江瑞安人,医学博士,主任医师。Tel:010-66939360, E-mail:fangxiangqun@hotmail.com

中性粒细胞对 BBF 的清除作用减弱;有研究表明,黏液型的 PA 在形成 BBF 后,与普通浮游细菌相比,中性粒细胞的趋化作用减退,中性粒细胞超氧化物产量也显著减少。黏液型 PA 的 BBF 基质的主要成分藻酸盐可以通过影响钙离子通道从而抑制中性粒细胞表面 C3 受体的表达^[9]。因此,细菌形成 BBF 以后,一方面对抗菌药物耐药,另一方面中性粒细胞对 BBF 细菌的清除作用减弱,导致 BBF 感染病灶细菌难以清除。

应该指出的是,弥漫性泛细支气管炎、囊性纤维化等的病灶因有 BBF 的持续存在不仅导致感染迁延不愈,而且还可以导致一系列免疫病理反应,日本学者小林宏行将之称为“呼吸道生物被膜病”(airway biofilm diseases)。临床研究表明,在 PA 反复感染的弥漫性泛细支气管炎患者血清中,抗藻酸盐抗体滴度显著升高并与疾病的恶化程度显著相关;同时,治疗有效的弥漫性泛细支气管炎患者血清中藻酸盐-抗藻酸盐抗体免疫复合物浓度逐渐下降,而治疗无效者无明显下降。动物试验的结果显示,实验小鼠在腹腔反复注射藻酸盐免疫后一次吸入 PA 可导致气道周围显著的淋巴细胞浸润,反复吸入后可见气道周围淋巴细胞形成肉芽肿样结构,导致气道狭窄变形,气道内可见中性粒细胞浸润,类似弥漫性泛细支气管炎的病理改变。另有动物试验表明,由于 PA 在气道的持续存在导致藻酸盐产生,刺激抗体产生并形成藻酸盐-抗藻酸盐抗体免疫复合物,沉积于肺组织,激活补体,中性粒细胞渗出,导致肺损伤。所以 BBF 相关感染不仅病灶细菌难以清除,由此还带来了一系列免疫病理反应造成气道和肺组织损伤^[9]。

2 细菌生物被膜相关感染的药物治疗

迄今为止,BBF 相关感染的治疗主要还是依靠抗菌药物,但现有的抗菌药物也存在着局限性,目前由于新的靶点已经发现,给 BBF 相关感染治疗带来了新的思路。

2.1 抗菌药物治疗 在 BBF 开始形成的 72h 内,由于 BBF 未形成稳态,对各种抗菌药物相对比较敏感,治疗的效果相对较好,以后的治疗效果就比较差。但有学者认为,联合应用大剂量的哌拉西林和妥布霉素对稳态的 PA 生物被膜或对静止期细菌有杀灭作用的抗菌药物如环丙沙星,对于稳态的大肠埃希氏菌生物被膜均有一定的疗效,但不可能彻底清除 BBF^[6]。

2.2 大环内酯类药物在治疗 BBF 相关感染的中的

作用 大环内酯类药物在治疗 BBF 相关感染中有着独特的作用。以 PA 的 BBF 为例,大环内酯类药物对 PA 无抑菌作用但却可以抑制 PA 产生藻酸盐及其他多糖物质,因此可以抑制 BBF 的形成并和其他抗菌药物在治疗 BBF 相关感染中起到协同作用,例如与氟罗沙星、亚胺培南等联合应用在体外和动物试验中都可以起到协同作用^[10]。以前的实验结果认为,只有 14 及 15 元环的大环内酯类药物可以起到上述作用,而 16 元环大环内酯类无效,但是构效分析表明,就抑制藻酸盐合成而言,只与大环内酯环 5 位侧链基团有关。如果将 5 位侧链上的碳霉糖消去,16 元环大环内酯类也具有抑制藻酸盐合成的作用^[9]。

另一方面,大环内酯类药物可以减低弥漫性泛细支气管炎患者血清中抗藻酸盐抗体及藻酸盐-抗藻酸盐抗体免疫复合物的浓度。小鼠在腹腔反复注射藻酸盐免疫后一次吸入 PA 可导致气道周围显著的淋巴细胞浸润,但如果提前给予大环内酯类药物处理,炎症反应将明显减弱^[9]。

2.3 群体感应系统 (quorum sensing system, QS)——治疗 BBF 相关感染的新靶点 细菌一旦形成稳定的 BBF 后,对抗菌药物高度耐药,难以被彻底清除,表明现有的抗菌药物在治疗 BBF 相关感染方面有一定的局限性,促使人们寻找治疗 BBF 感染的新方法,例如通过干扰 BBF 形成,使之不能形成稳定的结构,以期恢复对抗菌药物的敏感性;或者即使形成了稳态的 BBF,虽然抗菌药物难以清除,也可以通过抑制细菌致病因子表达来减轻由于感染而造成的组织损伤。而 QS 系统的发现则提供了这样一个理想的控制靶点。

在 1972 年就已经发现了某些弧菌有密度依赖的发光现象,即细菌群体在未达到一定的数目时并不发光,而当达到了一定的数目后却同时发光。也就是说,细菌可以“感应”(sensing)到周围同伴的存在,只有到了“法定人数”(quorum)即一定的群体才开始表现出一定的行为,所以称之为 QS 系统。进一步的研究表明,这些细菌可以向周围环境释放一类可以自由进出细菌菌体的小分子信号因子——高丝氨酸内酯(homoserine lactone, HSL),HSL 在 QS 系统中起着关键的作用。这一现象当时并未引起人们的重视,近年来的研究表明,类似的基因调节系统也广泛地存在其他革兰阳性和阴性细菌,特别是存在于临床上重要的致病菌如金黄色葡萄球菌、PA、大肠埃希氏菌等,并可调节下游许多致病因子基因的表达,从而越来越引起人们的关注^[11]。

例如,PA 有两个级联的以 HSL 为信号因子的

QS系统,即 LasR-LasI-C12-HSL 和 RhlR-RhlI-C4-HSL 系统,前者对后者有调控作用。当细菌进入对数生长期,细菌的密度增高,信号因子 3-*o*-c12-HSL 浓度升高,与 LasR 蛋白结合后可以激活一系列致病因子如弹性蛋白酶、外毒素 A、碱性蛋白酶、中性蛋白酶等的表达。另一方面,3-*o*-c12-HSL 又可激活 RhlR-RhlI 系统,促使后者释放信号因子 C4-HSL,与 RhlR 蛋白结合后也可调控下游一系列致病因子如弹性蛋白酶、磷脂酶 C、凝集素、鼠李糖酯等的表达^[12]。越来越多的实验结果表明, QS 系统不仅在控制着细菌毒素的表达同时也在生物被膜的形成及空间结构的保持方面起着重要的作用。Tielker 等发现 PA 胞膜上凝集素 LecB, Davey 等发现 PA 的鼠李糖酯在 PA 生物被膜形成中起到重要的作用,而这两者都受 RhlR-RhlI-C4-HSL 调控^[13,14]。LasR-LasI-C12-HSL 或 RhlR-RhlI-C4-HSL 缺陷的菌株不能形成典型的生物被膜结构且更易被抗菌药物或消毒剂清除。因此 QS 系统就成了一个既能控制 BBF 形成又能控制细菌毒素表达的新靶点^[15]。

目前正通过以下途径寻找抑制 QS 系统的药物:(1)抑制 HSL 的产生:Parsek 等^[16]发现 C4-HSL 的合成是在 RhlI 酶催化下,由 S-腺苷蛋氨酸和脂酰载体蛋白为底物合成的,由于 S-腺苷高半胱氨酸与 S-腺苷蛋氨酸分子结构相近,S-腺苷高半胱氨酸可与 S-腺苷蛋氨酸竞争结合 RhlI 酶,从而降低 C4-HSL 合成。但是由于人体内利用 S-腺苷蛋氨酸为底物的酶较多,S-腺苷高半胱氨酸及类似物不可避免地会干扰其他酶的作用,因此,寻找安全有效的化合物就成了一个研究方向。(2)抑制 HSL 与受体结合:目前研究较多的是吡喃酮类,已有的研究表明,该类物质可以和 HSL 竞争结合,抑制 QS 系统的启动从而干扰 BBF 形成以及致病因子的表达,动物试验也表明了其对 BBF 相关感染的治疗作用,但临床应用的安全性和有效性尚需进一步评价^[17]。

总之,虽然有关 BBF 相关感染致病机制的研究在某些方面取得了令人鼓舞的进展,也发现了一些治疗 BBF 相关感染的新方法,但是由于 BBF 相关感染的复杂性,如何预防和控制 BBF 相关感染仍然是一个亟待解决的问题。

参考文献

[1] Potera C. Forging a link between biofilms and diseases. *Science*, 1999, 283;1837-1839.
[2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial

biofilms; a common cause of persistent infection. *Science*, 1999, 284;1318-1322.
[3] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 35;187-209.
[4] Inigo L. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol*, 2006, 9;21-28.
[5] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 2001, 358;135-138.
[6] 方向群,刘又宁. 细菌生物被膜及难治性感染性疾病. *中华结核和呼吸杂志*, 1999, 22;186-187.
[7] Prince AS. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med*, 2002, 347;1110-1111.
[8] Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 2002, 416;740-743.
[9] Hobayashi H. Airway biofilm disease; clinical manifestations and therapeutic possibilities using macrolides. *J Infect Chemother*, 1995, 1;1-15.
[10] 方向群,刘又宁. 亚胺培南联合阿齐霉素治疗 PA 生物被膜感染中的实验研究. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17;254-257.
[11] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21;319-346.
[12] Smith RS, Harris SG, Phipps R, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation *in vivo*. *J Bacteriol*, 2002, 184;1132-1139.
[13] Tielker D, Hacker S, Loris R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectin Lec B is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, 2005, 151;1313-1323.
[14] Davey ME, Caiazza, NC, O' Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 2003, 185;1027-1036.
[15] Kirisits MJ, Parsek MR. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell Microbiol*, 2006, 8;1841-1849.
[16] Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, et al. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96;4360-4365.
[17] Rice SA, McDougald D, Kumar N, et al. The use of quorum-sensing blockers as therapeutic agents for the control of biofilm-associated infections. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005, 6;178-184.