

细菌生物被膜与抗菌药物耐药机制研究及治疗策略

杨学绘 马咏梅

(广州开发区医院 广州 510760)

摘要: 细菌导致感染问题的发生是感染性疾病发生的主要原因, 存在南(耐)药性和难治性等发展特点, 而且存在对抗机体的免疫清除作用, 对人类和动物的健康具有严重危害, 会为人们的日常生活和其他生活等方面带来严重的不良影响, 在此基础上, 相关问题受到临床上的极大关注。但是就细菌生物被膜对细菌抗药的耐药机制来看, 其在目前的发展中还不够清楚, 本研究则基于此, 探究细菌生物被膜对细菌生物抗药形成的几种机制进行阐述分析。(生物被膜是指附着于有生命或无生命物体表面, 被一些大分子包裹的有组织的细菌群体, 细菌自身产生的外部多糖基质、纤维蛋白质、脂蛋白等包裹着的菌细胞的结构, 具有多重耐药性及免疫逃逸能力, 因此具有高致病性、难治愈的特性, 可引起人和动物感染。目前, 防止感染策略是阻止微生物被膜菌落附着在物体表面, 有助于改善临床感染的治疗效果。近年, 对于生物被膜形成及其耐药机制的研究也是控制感染的重要研究方向。本文主要对细菌生物被膜形成过程、耐药性及耐药机制和治疗策略等方面进行综述, 以期对细菌生物被膜的控制提供参考。)

关键词: 生物被膜; 抗菌药物耐药机制研究(耐药性); 群体感染; 治疗策略

细菌生物被膜主要是指细菌在自身产生的外部多糖机制, 纤维蛋白质和脂蛋白等, 其中所包裹着菌细胞。这种被包被着生物被膜的细菌也被叫做被膜菌, 在自然界的发展中, 其处于单独存在的细菌个体, 被叫做浮游细菌, 而其中的被膜菌在形态结构和生理特征方面都与浮游细菌存在一定的差异性, 据研究数据表明, 就浮游细菌来说, 被膜菌更能够有效实现对抗生素灭菌效应的抵抗, 在一般情况下, 其被膜菌对抗生素的抵抗作用都起于粘附阶段, 对应的抗药性会在被膜的生长背景下出现逐渐增强的情况。对其之间的关系进行分析是尤为重要的。

1 细菌生物被膜与抗菌药物耐药机制关系分析

生物被膜是细菌在生存过程中产生的一特定生活方式, 能够保护细菌免受有害物质或环境的影响, 其产生受多种因素的影响, 且对抗菌药物耐药的影响存在多种机制。生物被膜形成能力对抗菌药物的敏感性具有明显影响, 与 Kim 等“研究结果基本一致。比较浮游状态下与生物被膜状态下测定的 MIC, 生物被膜与抗菌药物药性产生具有相关性, 使得同样的药物效用降低, 从而导致治疗失败也有研究认为, 形成的生物被膜是临床分离受不动杆菌一种主要的毒理因子, 其存在导致曼不动杆菌难以被抗菌药物清除从而加重感染, 与不动杆菌的慢性感染有相关性, 对患者的康复是一个严重的挑战生物被膜是细菌长时间存在于医院环境的一个原不动杆菌在不同材料上具有不同生物被形成能力, 在聚丙烯塑料上生物被膜形成能力比在玻璃材料上强, 且在振荡的条件下生物被膜形成能力比静止条件下强。

2 被膜菌抗菌药物耐药机制研究

就被膜菌的耐药机制来说, 其存在于多个方面, 其自身所对应的微生物个体不同, 对应的机制也是不同的, 从目前发展情况来看, 关于细菌生物被膜的耐药机制研究主要包括三个方面的解释。我们现在使用的大多数抗生素是由三种细菌和两种真菌产生的。其他细菌属, 包括乳酸杆菌、链球菌、非特异性白细胞增多症, 产生尚未明确定义的抗生物制剂。细菌对抗生素的耐药性是微生物在其环境中对化学物质进行解毒的天然产物。链霉菌和小单孢菌产生了多种常用抗生素, 它们进化出了对这些物质抵抗的复杂机制。其他细菌也做了同样的工作。不确定是否已经发现了对常用抗生素耐药的微生物种群, 这些微生物在前抗生素环境中培养的菌株之前和之后都没有接触过药物。

细菌生物被膜的屏障作用: 细菌生物被膜具有一定特点, 主要表现为在细胞外形成多糖机制, 其能够对药物基础包裹于被膜内的细胞, 但是就不同细菌生物被膜所对应的组织渗透作用也是不相同的。

细菌生物被膜的微环境改变: 细菌生物被膜的典型特点为营养

物质浓度的微阶梯梯度, 其与抗药性存在较大关系。根据研究发现, 氧气在细菌生物被膜的表面便会被消耗殆尽, 进而导致其深处处于一种厌氧环境中, 而氨基葡萄糖苷类抗生素对微生物的作用则处于厌氧条件下, 其明显低于有氧条件, 其中的酸性代谢产物局部会聚集, 进而导致细菌生物被膜内部的 PH 出现明显差异, 与细菌耐药性存在联系, 而且某些物质在消耗殆尽或是某些代谢性抑制物的聚集会导致细菌进入到一种非生长的状态, 逃避药物作用, 从而形成耐药性。

首先, 从营养限制学入手, 被膜菌生长速度相对较慢, 对应的生物被膜内的营养物质和氧气消耗速度较快, 而且其代谢废物的聚集等均会促进细菌进入到一种非生长的状态, 这种状态就是常说的饥饿状态。此状态的细菌对于抑制生长的抗生素并不敏感。但是也有相关数据指出, 在对微生物生长速度进行控制时, 就不同生长速度的被膜菌株和浮游菌株来说, 其所对应的耐药性也是存在较大差异性的, 在这种情况下, 仅仅对被膜菌的生长速度分析便对其耐性进行解释, 是难以得到满意答案的。

其次, 就抗生素渗透障碍来说, 其细菌生物被膜的一个明显特征为细菌密度较高, 而且相邻的细菌之间空隙狭小, 并能和成熟灵敏成分与浮游细菌差异较大的胞外基质。其中的主要成分为不溶于水的胞外多糖, 其形成了被膜菌生长的外环境, 而就三维生物的被膜结构来说, 可实现对被膜菌形成保护作用。在生物被膜中, 大部分的细胞外基质和菌株之间的空间都较为狭小, 会对抗生素穿透生物造成阻碍, 形成一道屏障, 这时的抗生素仅仅能够将被膜表面的浮游细菌杀死, 并不能促进向深部细菌的渗透, 难以形成深部细菌浓度。这些细菌会形成菌囊样的结构形态, 导致慢性感染问题的发生。

最后, 从被膜菌较为独特的表型结构来说, 在生物被膜形成菌的过程中, 研究主要是这怎对铜绿假单胞菌进行深入, 这种铜绿假单胞菌具有独特的生物学特性, 主要与生物被膜形成和高耐药性之间存在紧密联系。在铜绿假单胞菌生物被膜形成过程中, 细胞之间的信号传导系统是尤为重要的, 此系统的实际应用主要是对细菌进行监测, 进而促进对群体细胞的调节, 该系统会参与到细菌生物被膜的分化过程中, 细菌所对应的密度感应系统中会通过特定的基因进行表达, 进而将生物被膜中的营养物质运输好废物有效排出。避免细菌出现过度生长的情况, 减少对空间和营养物质缺乏的影响^[1]。就酰化高丝氨酸内酯来说, 其已经被临床证实为一种生物被膜内细胞间的主要信号传递分析, 根据体外研究结果显示, 此类细菌群体对系统健全的细菌进行感应, 进而促进有效的抗菌生物被膜出现, 而就群体感应系统缺陷的细菌来说, 其并不能将生物被膜进行完全产生, 一旦在群体感应系统缺陷的细菌中将 AHL 进行加入,

其细菌就会促进完整生物被膜能力的产生,如果在群体感应系统中促进群体感应拮抗剂的应用,则会促进结构疏松并不完整的生物被膜生长。

抗生素的疗效取决于其在微生物学中达到目标的能力。细菌细胞的结构对药物的渗透性和抗生素的活性有重要的影响。许多革兰氏阳性和革兰氏阴性杆菌具有多孔的外囊,典型的外囊由多糖组成。胶囊对抗生素进入细菌细胞的网状结构几乎没有或根本没有障碍。然而,在铜绿假单胞菌感染囊性纤维化患者时,氨基糖苷类药物可能与高粘液性囊膜有一定程度的结合用于治疗感染中抗菌药物的选择。

抗生素的疗效取决于其在微生物学中达到目标的能力。细菌细胞的结构对药物的渗透性和抗生素的活性有重要的影响。许多革兰氏阳性和革兰氏阴性杆菌具有多孔的外囊,典型的外囊由多糖组成。胶囊对抗生素进入细菌细胞的网状结构几乎没有或根本没有障碍。然而,在囊性纤维化患者定植的铜绿假单胞菌株中,氨基糖苷类物质可能与高度粘液样囊膜结合,从临床的发展情况来看,世界上大多数国家都在此问题研究上投入了大量的人力和物力,财力等,为了对细菌生物被膜对环境,工业和医疗等事业的严重危害进行控制和降低。

3 被膜菌抗菌药物耐药机制实施策略

与其他微生物合用以获取稀缺资源。我们现在使用的大多数抗生素是由三种细菌和两种真菌产生的。其他细菌属,包括乳酸杆菌、链球菌、非特异性白细胞增多症,产生尚未明确定义的抗生物制剂。细菌对抗生素的耐药性是微生物在其环境中对化学物质进行解毒的天然产物。链霉菌和小单胞菌产生了多种常用抗生素,它们进化出了对这些物质抵抗的复杂机制。其他细菌也做了同样的工作。不确定是否已经发现了对常用抗生素耐药的微生物种群和栖息地,这些微生物在前抗生素环境中培养的菌株之前和之后都没有接触过药物

3.1 抑制微生物粘附

就细菌来说,其通常是在素蛋白上进行粘附,并对宿主细胞的表面受体进行特异性识别,进而实现在宿主细胞的表面上进行粘附,这时细菌在宿主体内形成生物被膜的第一步。因此,要想实现对细菌粘附和定制的有效抑制,则需要对细菌生物被膜的产生进行控制,这是重要内容。就各种常见的医用导管进行改进,这是对细菌粘附进行抑制的主要方法,能够有效避免细菌的克隆和定植。均大量研究数据结果显示,抗生素的压抑菌药物浓度,可实现对初始阶段粘附在医疗器械上细菌和生物被膜的抑制,在此研究过程中,研究人员对几种粘附在丙烯酸树脂上的凝固酶阴性葡萄球菌进行了评估,首先进行分株,然后对其万古霉素,双氯苯唑青霉素和头孢唑林等抗生素联合作用的康肾肾功能疏后牙抑菌浓度效应对粘附阶段的生物被膜进行观察,探究其对相关阶段的影响,其结果显示,所有抗生素几乎都将细菌的粘附性降低。

3.2 对细菌细胞间信号系统的抑制

受到细胞间信号系统在调节生物被膜中具有重要作用的因素影响,可以将控制其信号作为基础,实现对生物被膜形成的抑制研究的重要方法^[2]。但是如果铜绿假单胞菌在缺乏密度感应调节系统的情况下,其所形成的生物被膜厚度都相对较低,会与菌体结合较为紧密,甚至难以对细胞外基质进行观察,而且对卡拉霉素的敏感性也相对较低,其明显大于野生菌株所产生的生物被膜敏感性。从海洋环境入手,其中所发现的天然呋喃酮类混合物会在一定环境下形成衍生物,可对铜绿假单胞菌的密度感应系统进行抑制,促进铜绿假单胞菌生物被膜对抗生素药物易感性的增强,根据Hwntzer 研究报道显示,有一种人工合成的卤代呋喃酮化合物,其会对被膜菌的密度感应调控系统造成影响,这种化合物仅仅会影响蛋白质的合成和细菌的生长,听不会对细菌生物被膜的形成及其起始阶段的粘附过程造成影响,也不会对生物被膜的早期发展造成组

织,但是其却能够将生物被膜中毒力因子的产生造成影响,会导致生物被膜厚度减少,而且呋喃酮会在蘑菇状生物被膜深处进行渗透,在经过呋喃酮处理后,此时的生物被膜对0.11%的十二烷基硫酸钠较为敏感,对妥布霉素也更加敏感,这些药物能够穿透生物被膜,将其中95%以上的细菌杀灭,而没有经过呋喃酮作用的对照组效果,其药物作用较为表浅,仅仅能够将生物被膜表明的细菌杀死^[3]。

3.3 将超声和抗生素联合应用

超声波可将细菌杀死是众所周知的,那么,超声波是否可以实现对生物被膜的控制呢,根据相关研究显示,在67KHz的范围内将超声进行使用,虽然其难以实现为细菌造成抑菌效果,也不能将菌活性杀死,但是其却能够将庆大霉素类药物对浮游状态时的铜绿假单胞菌和大肠埃希氏菌的抑制和杀菌活性进行增强。即使是面对处于生长旺盛期的细菌来说,其细菌本身具有较强的作用,可实现对单独抵抗庆大霉素的效果,在将超声波进行应用时,其可将细菌对药物的抵抗性进行消除。与此同时,超声波也会促进庆大霉素类药物对生物被膜穿透作用的增强。Rediske 等人进行动物体外实验,其结果发现,在将生长在聚乙烯膜版上的大肠埃希氏菌的生物被膜皮进行移植时,将其放置在兔的背后,将实验兔子分为两组,均给予频率在28.48KHz,功率为300mW/cm²的超声波下进行治疗。时间均为24小时,其中一组给予庆大霉素和全身联合用药,另一组则不给予任何药物,其结果显示,仅仅应用超声波治疗的兔子对细菌的活性几乎不存在影响,而使用庆大霉素和超声波联合治疗的兔子,其细菌的活性得以降低,证实了庆大霉素与超声波联合使用的效果显著。但是这种实验对于皮肤组织具有一定程度的损害性,因此,并不能应用在人体实验中,需要先将不利因素进行消除^[4]。

3.4 运用生物电效应与抗生素联合

就同一种细菌来说,在将低电流和抗生素进行联合使用时,其效果通常显著于单独使用抗生素治疗,能够举哀能够被膜菌进行杀灭,产生生物电效应。根据Caubet 的研究显示,在将改良了的生物电效应用在生物被膜中时,将无线射频电流与抗生素进行联合使用,其应用可与直流电所产生的电效应产生同样的效果,而且其在RMS的频率可被控制在10MHz时,能够实现对新离子产生的有效防止作用,避免电解效应的产生,对应的应用前景较好。但是就生物电效应机制来说,目前并没有相关报道^[5]。

3.5 生物被膜的细胞外基质讲解

溶葡萄球菌是人类分泌物中的一种构成成份,其中的双甘氨酸内切酶能够实现葡萄球菌肽聚糖上的五甘氨酸横桥的特异性切断,对应的浓度可将浮游状态下的金黄色葡萄球菌杀灭,而且在开展体外实验时,其能够在塑料袋制品和玻璃表明附着金黄色葡萄球菌生物被膜进行降解^[6]。与此同时,另外一种人类分泌物成分,乳铁蛋白,其能够实现铜绿假单胞菌生物被膜生长的阻碍,就不同的化学药物来说,其能够被证明为对被膜菌具有积极作用。Nemoto 等人的研究结果显示,链球菌激酶和链球菌脱氧核糖酶的联合用药,可实现对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌铜绿假单胞菌的生物被膜产生有效的抑制活性。而Hatch 等人则发现海藻酸裂解酶可将氨基糖苷类药物在铜绿假单胞菌生物被膜上的渗透和扩散进行增加。在实验的实际开展过程中,在大蒜中将大蒜素进行提取,这时一种具有硫磺的复合物,能够由大蒜素中的小部分蒜苷经过酶促反应而形成。在给予患者人体外实验后,可得出大蒜素能够将表皮葡萄球菌和白色念珠菌的感染进行抵抗,并实现对生物被膜形成的有效抑制^[7]。

3.6 噬菌体抑制细菌生物被膜的生长

噬菌体疗法主要是将噬菌体及其产卵进行应用,实现对各种细菌性感染疾病的预防,在实际的实施过程中,即使其噬菌体在90年代前已经实现成功分离,但是受到抗生素时代的发展来临,噬菌体在临床上难以得到较为广泛的应用,大部分耐药性菌株出现,导致人们不得不选择一种有效的对细菌疾病进行抑制的方法,而噬菌体的运用,其细菌病毒对细菌性感染进行治疗的方法是新颖的,引

起人们的广泛关注。就噬菌体来书,其需要对包被在生物被膜中的细菌造成影响作用,就需要将细胞表面的糖被突破^[8-10]。而噬菌体基因组中存在能够将细菌胞外多糖物质进行分解的成分,据 Wasfi R^[11]等人的研究来看,对噬菌体基因组的一个编码胞外多糖解聚酶的基因进行克隆和表达,其对应的表达蛋白质对宿主军胞外多糖具有降解活性的作用。此外,Wang M^[12]等人的研究还表明噬菌体可通过产生较多的糖解聚酶,实现对生物被膜的特异性降解,并在酶量较为充足的情况下,实现对整个生物被膜结构的破坏。根据最近的研究结果来看,尽管其体内缺乏内在动力,对应的噬菌体均能够将整个铜绿假单胞菌生物被膜的藻酸盐进行完全扩散,从而实现对胞外多糖粘度的减少,并将一定数量的胞内细菌杀灭^[12-16]。

结语:总之,人类对生物被膜的研究还处于初始阶段,还有很多问题需要被解决,尤其是针对耐药机制和遗传性状方面的研究。只有在加强对生物被膜的形成机制和致病机理进行了解的情况下,才能实现从根本入手,采用正确的应对策略,实现对生物被膜形成菌而导致的细菌生物被膜病的控制,保证人们的生命安全。

参考文献:

- [1]李碗芯. 浮游态和生物被膜状态嗜水气单胞菌对四环素耐药相关蛋白的研究[D].福建农林大学,2016.
- [2]孙莉娜. 迟钝爱德华氏菌生物被膜状态下耐药相关基因与蛋白的研究[D].福建农林大学,2016.
- [3]李欣燃. Hfq 对肺炎克雷伯菌耐药性影响和机制初探及 Hfq 抑制剂虚拟筛选[D].吉林大学,2016.
- [4]吴帆. 宁夏地区牛源金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因检测及耐药性研究[D].宁夏大学,2017.
- [5]马保瑞. 大肠杆菌对消毒剂及抗菌药物交叉耐药机制的初步研究[D].西南大学,2013.
- [6]邹自英,刘霞,刘媛. 临床分离铜绿假单胞菌耐药机制研究[J].西南国防医药,2018,28(04):360-362.
- [7]刘红波. 生物被膜分散活性物质与抗生素联合消除生物被膜作用的研究[D].中南大学,2014.
- [8]黄程程. 木犀草素逆转 *T.pyogenes* 大环内酯类耐药性的作用及机制研究[D].沈阳农业大学,2018.
- [9]DONG Rong, GUAN Chun, HU Dan, et al. The correlation study on antimicrobial resistance and biofilm related genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(8):493-494.
- [10]Ma L, Mi H, Xue Y, et al. The mechanism of ROS regulation of antibiotic resistance and antimicrobial lethality[J]. Hereditas, 2016, 38(10):902-909.
- [11]Wasfi R, Mansour L, Hashem A, et al. Antimicrobial activities against biofilm formed by *Proteus mirabilis* isolates from wound and urinary tract infections[J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2012, 30(1):76.
- [12]Wang M, Shen W, Yan L, et al. Stepwise impact of urban wastewater treatment on the bacterial community structure, antibiotic contents, and prevalence of antimicrobial resistance[J]. Environmental pollution (Barking, Essex : 1987), 2017, 231(Pt 2):1578.
- [13]Zhang T, Dong J, Cheng Y, et al. Genotypic diversity, antimicrobial resistance and biofilm-forming abilities of *Campylobacter* isolated from chicken in Central China[J]. Gut Pathogens, 2017, 9(1):62.
- [14]Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(suppl 1):i37-i40.
- [15]冯星火,赵广福,崔连东,关欣,王宏达. 铜绿假单胞菌生物被膜对抗菌药物作用影响的实验研究[J]. 微生物学报 2000(2):210-213.
- [16]王世平,翟艳慧,谢克亮. 输尿管支架管细菌生物被膜的病原菌分布及耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013(23):26-28.