论著

文章编号:1000-5404(2008)-0060-04

氨溴索对铜绿假单胞菌生物膜结构的影响

李 芳,余加林,刘官信,杨 华 (重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

摘 要:目的 建立铜绿假单胞菌生物膜(biofilm,BF)模型,探讨氨溴索对粘液型铜绿假单胞菌成熟BF的结构影响。**方法** 平板培养法培养铜绿假单胞菌7 d,得到成熟BF,用扫描电镜(scanning electron microscope,SEM)观察氨溴索对BF形态结构的影响;激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy,CLSM)结合BF图像结构分析软件(image structure analyer,ISA)对BF结构参数分析;荧光显微镜定性观察氨溴索对BF内活菌的作用,并测定氨溴索单独作用以及与环丙沙星联用后BF内活菌的荧光强度。**结果** 氨溴索作用后电镜观察可见BF被破坏,基质样物变稀疏,仅见少量散在细菌。ISA软件定量分析显示:2 mg/ml氨溴索作用后,BF厚度、平均扩散距离(average diffusion distance,ADD)和结构熵(textual entropy,TE)均减少($P<0.05$);区域孔率(areal porosity,AP)增加($P<0.05$)。0.75 mg/ml氨溴索干预后,有同样趋势,但效应不如高浓度明显。用荧光显微镜定性观察,当氨溴索浓度大于0.49 mg/ml时,BF内活菌数减少。同时,氨溴索与环丙沙星存在协同作用($F=15.1$,$P<0.05$),且随着氨溴索浓度升高,协同作用增强。**结论** 氨溴索可影响铜绿假单胞菌成熟BF形态结构,从而增强抗生素的杀菌活性。

关键词:氨溴索;铜绿假单胞菌;生物膜
中图法分类号:R378.991;R965;R974 **文献标识码:**A

Effect of ambroxol on the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

LI Fang, YU Jia-lin, LIU Guan-xin, YANG hua (Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To observe the effect of ambroxol on the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm (BF) in an established biofilm model *in vitro*. Method Mature BF was formed after 7 days' culture of *Pseudomonas aeruginosa* on plate. The BF structure was observed by scanning electron microscope (SEM). The parameters of BF structure were analyzed though pictures from confocal laser scanning microscopy (CLSM) with Image Structure Analyzer (ISA) software. Fluorescence intensity of the viable bacteria in BF treated by ambroxol alone and together with ciprofloxacin were determined with fluorescence microscopy. Results After the treatment of ambroxol, the BF was destroyed and the matrix outsides became thin and abnormal compared with the control by SEM, and small amount of bacteria dispersed. The results of ISA showed that with the treatment of 2 mg/ml ambroxol, BF was decreased in thickness, average diffusion distance (ADD) and textual entropy (TE) were decreased in comparison with the group without ambroxol treatment ($P<0.05$), however areal porosity (AP) was increased ($P<0.05$). Whereas the same tendency of these parameters was seen in the group treated by 0.75 mg/ml ambroxol though not so obvious. Fluorescence microscopy indicated the viable bacteria in BF was reduced significantly ($F=18$, $P<0.05$) when ambroxol concentration was higher than 0.49 mg/ml, and ambroxol showed synergistic effect when combined with ciprofloxacin ($F=15.1$, $P<0.05$) in a dose-dependent manner. Conclusion Ambroxol can affect the BF structure of *Pseudomonas aeruginosa*, and thus enhance the bactericidal ability of antibiotics.

Key words: ambroxol; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm

生物膜(biofilm,BF)是细菌黏附在物体表面上形成的一种具有高度结构性的膜状复合物,其主要成分是细菌分泌的胞外基质和细菌菌体[1]。BF可使细菌抵御宿主免疫系统和抗菌药物杀伤作用,从而产生对抗菌药物的高度耐药性(可达到浮游状态的10~1 000倍),导致感染难以清除[2]。铜绿假单胞菌是极为常见的细菌生物膜相关感染病原菌。新生儿由于其

基金项目:国家自然科学基金(30772363);重庆市自然科学基金(渝科发计字2007-340)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772363) and Natural Science Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2007-340)
作者简介:李 芳,女,重庆市人,博士研究生,主要从事新生儿感染方面的研究。电话:(023)63612756,E-mail:rematali@hotmail.com
通信作者:余加林,电话:(023)63632756-3531,E-mail:yujialin486@sohu.com
收稿日期:2007-07-12 修回日期:2007-07-27

生理特殊性，常受铜绿假单胞菌感染。特别是进行机械通气的患儿，痰培养常有铜绿假单胞菌生长。铜绿假单胞菌生物膜的形成是新生儿呼吸机相关性感染难以控制的重要原因。国外有报道，化痰药 N-乙酰半胱氨酸干扰生物膜形成[3]，氨溴索作为一种临床常用药与 N-乙酰半胱氨酸在作用机制上有一定的相似性，故我们推测氨溴索可能具有抗 BF 作用。本研究将考察氨溴索对铜绿假单胞菌 BF 结构的影响，且与抗生素环丙沙星联用是否具有协同作用。

1　材料与方法

1.1　菌株和主要试剂、仪器

铜绿假单胞菌临床分离菌株（由本院检验科鉴定并保存），Luria-Bertani 培养基（LB，上海升博生物技术公司），氨溴索标准品（德国 Boehringer Ingelheim 公司）环丙沙星标准品（重庆市药检所），比浊仪（德国 Siemens 公司），多功能酶标仪（美国 BIORAD UV-3350 型），荧光显微镜（德国 Leica 公司），SEM（美国 Amary 公司 KYKY3200，第三军医大学电镜室提供），24 及 96 孔培养板（德国 Corning 公司），荧光染色剂 SYTO9（激发波长 480 nm，发射波长 500 nm）。ISA 软件（美国 Montana 州立大学 Haluk Beyenal 教授提供）。

1.2　环丙沙星最低抑菌浓度（microbial inhibition concentation，MIC）的测定

采用微量稀释法[4]测定环丙沙星对铜绿假单胞菌的 MIC，质控菌株为 ATCC27853。

1.3　铜绿假单胞菌 BF 体外模型的建立

用平板法培养铜绿假单胞菌 BF[5]。取隔夜培养的含有铜绿假单胞菌的 LB 培养液，用比浊仪调至 0.5 麦氏单位。分别吸取菌液 1 ml 加入 24 孔板（其内放有 8 cm × 8 cm 玻片），0.1 ml 加入 96 孔板。37 ℃培养，每 48 小时换液 1 次，连续培养 7 d 后，即可形成稳定的 BF[1]。

1.4　铜绿假单胞菌 BF 形态的扫描电镜 SEM 检测

本部分实验分为两组：对照组、氨溴索组（浓度为 3.75 mg/ml）。两组用平板法培养细菌 7 d 后，在 24 孔板内分别加入 1 ml LB 培养基和氨溴索，37 ℃孵育 24 h 后取出，用磷酸缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）反复清洗，去除浮游菌。立即用 2.5% 戊二醛 PBS 溶液固定 2 h 后，再经 0.1 mol/ml PBS 冲洗 2 次（pH = 7.2），30% ~ 100% 系列浓度乙醇脱水后，经 50% ~ 100% 叔丁醇置换，干燥、离子溅射仪喷金，经过 SEM 观察铜绿假单胞菌 BF 微观形态。

1.5　BF 结构参数的分析

本部分实验分为 3 组：对照组、氨溴索组（浓度分别为 2、0.75 mg/ml）。两组用平板法培养细菌 7 d 后，在 24 孔板内分别加入培养基和氨溴索，37 ℃孵育 8 h 后，将各组模型从培养液中取出，每张玻片用 1 ml 去离子水轻轻洗涤 3 次，除去 BF 表面的游离细菌。在每张玻片 BF 表面滴加 50 μl 配制好的荧光染液，37 ℃避光孵育 15 min，再用 1 ml 去离子水冲洗未结合荧光染色剂后，置 CLSM 观察，由 BF 游离面向 BF 与玻片附着面逐层扫描（沿 Z 轴扫描），每个标本取 5 个随机视野，每个视野扫描 8 ~ 16 层。所获得图片堆数据调入 ISA3D 软件，设置参数后，运行 ISA 及 ISA3D 命令。运行结果包括：①结构参数（textual parameter）：如结构熵（textual entropy，TE）。②平面参数（areal parameter）如区域孔率（areal porosity，AP）、平均扩散距离（average diffusion distance，ADD）[7] 等。输出结果以 Excel 格式保存。

1.6　细菌 BF 内活菌荧光强度的观察

本部分实验分为 6 组：1 组空白对照、5 组不同浓度氨溴索组（浓度依次为 3.75、1.875、0.95、0.49、0.25 mg/ml）。在 24 孔板加入 1 ml 菌液，平板法培养 7 d 后，分别加入 1 ml 上述浓度的氨溴索和 LB 培养基，37 ℃孵育 8 h 后取出。各组模型从培养液中取出，每张玻片用 1 ml 去离子水轻轻洗涤 3 次，除去 BF 表面的游离细菌。在每张玻片 BF 表面滴加 50 μl 配制好的荧光染液，37 ℃避光孵育 15 min，再用 1 ml 去离子水冲洗未结合荧光染色剂后，置于荧光显微镜下观察。

1.7　多功能酶标仪定量分析氨溴索与环丙沙星合用后细菌 BF 内活菌荧光强度

在细菌培养 7 d 后，棋盘法在 96 孔板内分别加入 0.1 ml 不同浓度的氨溴索（浓度依次为 3.75、1.875、0.95、0.49、0.25、0 mg/ml）和环丙沙星（浓度依次为 8、4、2、1、0.5、0.25、0 μg/ml），37 ℃孵育 8 h 后取出，同样采取上述荧光染色后，用多功能酶标仪检测各孔荧光强度。

1.8　统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行正态性分布检验，均符合正态性分布后进行单、双因素方差分析。

2　结果

2.1　环丙沙星 MIC

环丙沙星的 MIC 为 1 μg/ml。

2.2　SEM 观察铜绿假单胞菌 BF 形态

经过各组处理后铜绿假单胞菌 BF 的 SEM 见图 1，从图中可以看出，细菌培养 7 d 后，形成成熟的 BF。对照组 BF 在载体表面形成片状物，周围有厚薄不均的黏液状物质连接成一大片，细菌包裹其内；氨溴索处理组铜绿假单胞菌 BF 变得稀疏，不规则，仅见少量散在细菌。

2.3　ISA 软件对铜绿假单胞菌 BF 结构进行定量分析结果

将各组 BF 与进行 CLSM 扫描的输入 ISA 软件分析，得到 BF 结构的定量分析结果（表 1）。

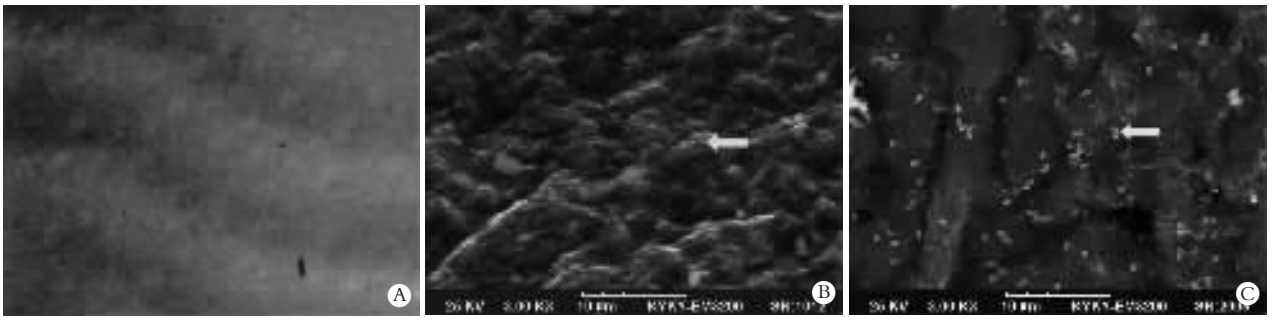
表 1　BF 模型各组各参数分析结果

组别	厚度（μm）	AP	ADD	TE
生理盐水对照	39.22 ± 2.01	0.70 ± 0.03	1.080 ± 0.001	6.25 ± 0.22
氨溴索（2 mg/ml）	10.09 ± 2.32[a]	0.91 ± 0.02[a]	1.000 ± 0.002[a]	5.19 ± 0.41[a]
氨溴索（0.75 mg/ml）	20.10 ± 2.86[a]	0.82 ± 0.04[a]	1.030 ± 0.004[a]	5.36 ± 0.34[a]

a：$P < 0.05$，与生理盐水对照组比较

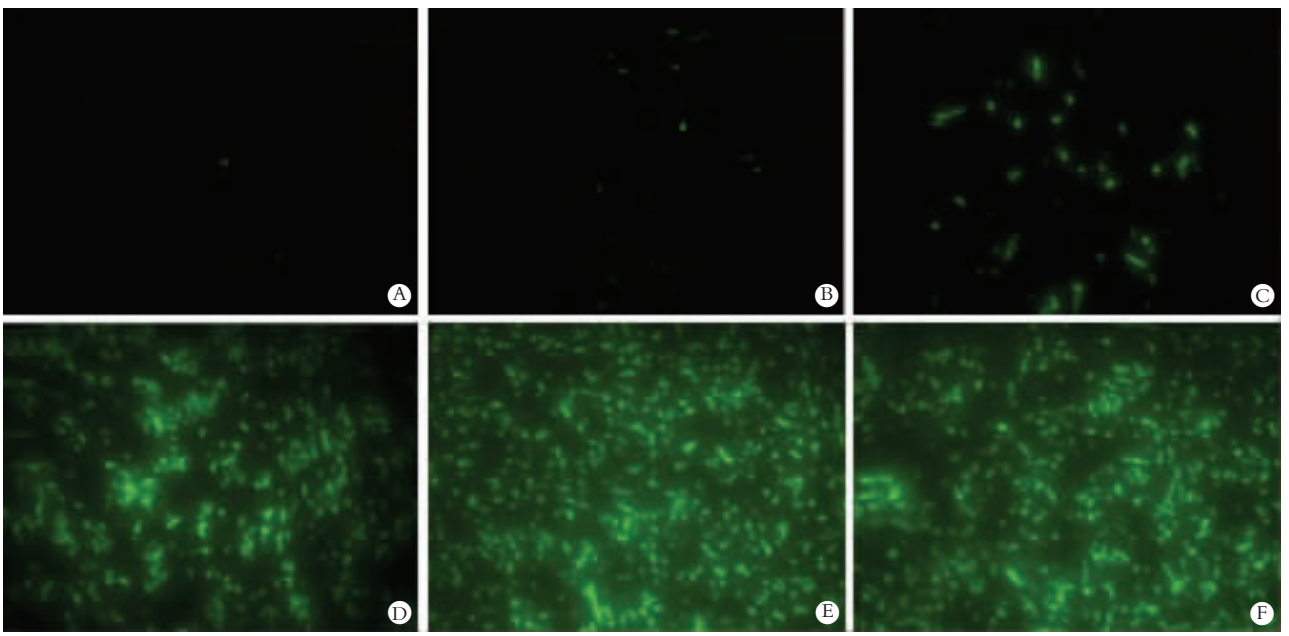
2.4　荧光显微镜观察氨溴索对成熟 BF 的影响

将各组玻片置于荧光显微镜下观察，可见随着浓度的升高，细菌减少，在浓度达到 0.5 mg/ml 时，与生理盐水对照组大致相当。定性推测较高的浓度下，氨溴索可干扰成熟 BF，包括其胞外基质和其内细菌。



A：空白对照组；B：生理盐水对照组；C：氨溴索组(3.75 mg/ml)；⇧：细菌

图1 平板培养铜绿假单胞菌7 d后成熟BF (SEM×3 000)



A～E：氨溴索浓度依次为4、2、1、0.5、0.25 mg/ml；F：生理盐水对照组(绿色示铜绿假单胞菌)

图2 氨溴索对BF内活菌的影响荧光图 (荧光显微镜×400)

2.5 多功能酶标仪定量检测BF内活菌荧光强度

随着氨溴索浓度的升高，培养板内细菌的荧光强度下降，说明BF内活菌减少，统计学分析显示当氨溴索浓度达到0.49 mg/ml时，与对照组存在差异($F=16$，$P<0.05$)。当氨溴索与环丙沙星联合使用，产生协同效应(F=15.1，$P<0.05$)，见表2。同时，随着氨溴索浓度升高，协同作用加强。

表2 不同浓度氨溴索与环丙沙星联用后BF内细菌荧光强度($\bar{x}\pm s$)

盐酸氨溴索浓度	环丙沙星浓度(μg/ml)						
(mg/ml)	0	0.25	0.5	1	2	4	8
0	19 201.0±68.0	18 521.0±65.9	18 002.0±67.4	17 972.0±67.1	17 652.0±66.7	17 412.0±64.1	16 712.0±64.3
0.25	18 721.0±62.8	18 219.0±68.8	18 042.0±66.9	17 925.0±69.1	17 569.0±66.3	17 322.0±63.5	16 681.0±67.8
0.49	12 623.0±63.5[a]	12 364.0±63.1	11 964.0±60.4	11 732.0±60.5	11 412.0±63.6	11 343.0±64.1	11 201.0±65.5
0.95	12 115.0±68.2[a]	10 725.0±73.4	9 902.0±68.3	9 442.0±65.7	9 355.0±64.2	9 122.0±63.5	8 636.0±69.7
1.875	7 659.0±71.5[a]	7 024.0±66.1	6 865.0±66.5	6 195.0±69.4	5 811.0±65.2	5 534.0±67.1	5 210.0±62.4
3.75	4 587.0±66.2[a]	4 375.0±68.5	4 342.0±67.5	3 992.0±68.1	3 746.0±65.3	3 512.0±66.1	3 308.0±62.3

a $P<0.05$，与0 mg/ml盐酸氨溴索浓度比较

3 讨论

近年来，新生儿导管相关性感染问题日益突出。由于新生儿特殊的生理特点，常受铜绿假单胞菌感染。一旦细菌形成BF，由于其渗透限制作用[7]，以及其内细菌所处的微环境改变[9]等原因，导致细菌耐药性增强，感染难以清除。尽管国外有报道卤代呋喃唑酮[8]，及藻酸盐抗体[9]等有破坏BF的作用，然而尚未应用于新生儿临床治疗，因此，寻找一种有效可行抗铜绿假单胞菌BF的临床用药具有极为重要的意义。氨溴索是新生儿临床常用药物，不仅是一种黏液溶解剂，还具有抗炎、抗氧化、抑制炎性介质、松弛气道平滑肌、促进肺表面物质的合成与其他药物协同等作用。

我们采用平板培养法，7 d后得到成熟的BF。在

SEM 下观察，成熟 BF 呈团状聚集，由于其外包裹大量细菌分泌的基质物，其内细菌隐匿不见 在氨溴索的作用下，成熟的 BF 结构被破坏，变得稀疏、不规则，可见少量细菌散布。说明一定浓度的氨溴索可影响 BF 的形态，破坏其结构的完整性。ISA 软件分析结果显示，2 mg/ml 氨溴索作用后，BF 厚度由（39.22 ± 2.01）μm 减少到（10.09 ± 2.32）μm，说明氨溴索破坏了 BF 固有结构，我们推测氨溴索对 BF 的主要成分胞外多糖有抑制生成和/或促进降解的作用。AP 和 ADD 这两个参数，客观反映 BF 结构发展过程中间隙孔道及营养物质供应距离的变化。作用后 AP 由（0.70 ± 0.03）增加到（0.91 ± 0.02），ADD 由（1.080 ± 0.001）减少到（1.000 ± 0.002），说明氨溴索使 BF 变得更加稀疏，菌落间的孔道和间隙增加，这样可以加强抗生素的渗透，使 BF 深层细菌可以接触到有效剂量的抗生素。TE 反映 BF 的不均一性，而细菌 BF 的不均一性是细菌生存的重要手段[11]。TE 由作用前的（6.25 ± 0.22）减少到（5.19 ± 0.41），也进一步说明氨溴索作用后，BF 的不均一性减小，结构趋于简单，对外界的抵抗力减弱。同样，0.75 mg/ml 氨溴索作用后也可使 BF 厚度变薄，结构变得稀疏简单。但其作用效应没有高浓度 2 mg/ml 时明显。同时我们采用生物发光法直观地观察氨溴索对铜绿假单胞菌 BF 内活菌的影响，结果显示随着氨溴索浓度的升高，BF 内黏附的活菌减少，说明氨溴索对铜绿假单胞菌 BF 有破坏作用。临床上常用抗生素如环丙沙星对 BF 状态的铜绿假单胞菌的杀灭作用不强。我们用多功能酶标仪检测不同浓度环丙沙星与氨溴索联合应用对细菌的作用，结果显示它们具有协同抑制作用，且随着氨溴索浓度升高，协同作用增强，BF 内活菌进一步减少，环丙沙星的杀菌活性增强。这说明氨溴索破坏了 BF 结构的完整性，环丙沙星增强了对 BF 的穿透能力，并提高了对 BF 中细菌的杀灭能力。由此我们认为，氨溴索对铜绿假单胞菌 BF 有破坏作用，与其他抗生素联用可以提高其杀菌能力，为氨溴索的抗 BF 应用提供了理论基础，为新生儿难治性铜绿假单胞菌感染的临床治疗提供新的思路。对于氨溴索抗 BF 的作用的具体机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Cogan N G, Keener J P. The role of the biofilm matrix in structural development[J]. Math Med Biol, 2004, 21(2): 147 – 166.

[2] Borriello G E, Werner E, Roe F, *et al*. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of Pseudomonas aeruginosa in biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2659 – 2664.

[3] Olofsson A C, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(8): 4814 – 4822.

[4] 戴自英. 临床抗菌药物学[M]. 北京：人民卫生出版社, 1985：7 – 9.

[5] Ashby M J, Neale J E, Knott S J, *et al*. Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of Escherichia coli[J]. J Antimicrob Chemother, 1994, 33(3): 443 – 452.

[6] Beyenal H, Lewandowski Z, Harkin G. Quantifying biofilm structure: facts and fiction[J]. Biofouling, 2004, 20(1): 1 – 23.

[7] Stewart P S, Costerton J W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms[J]. Lancet, 2001, 358(9276): 135 – 138.

[8] Pappas K M, Weingart C L, Winans S C. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies on signal synthases and receptors required for intercellular signalling[J]. Mol Microbiol, 2004, 53(3): 755 – 769.

[9] Pier G B, Boyer D, Preston M, *et al*. Human monoclonal antibodies to Pseudomonas aeruginosa alginate that protect against infection by both mucoid and nonmucoid strains[J]. J Immunol, 2004, 173(9): 5671 – 5678.

[10] Boles B R, Thoendel M, Singh P K. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(47): 16630 – 16635.

（编辑　薛国文）

《中国医科大学学报》征订启事

《中国医科大学学报》为全国性医药卫生综合类学术期刊，国内外公开发行。于 1951 年创刊，为中国综合性医药卫生类核心期刊，《中国科技论文统计与分析》、《中国科学引文索引》统计源期刊。已进入美国化学文摘（CA）、美国生物学文摘（BA）、俄罗斯文摘杂志（AJ）、英国《国际农业与生物科学研究中心》（CABI）、美国《剑桥科学文摘：自然科学》（CSA：NS）等重要检索系统。并被国内中文生物医学期刊目次数据库、中国科技期刊中医药文献索引、中文科技资料目录、中国生物医学文献光盘数据库、中国科学技术期刊文摘数据库、万方数据资源系统等多种权威数据库收录。

本刊登载国内外广大医药卫生科研工作者在医疗、教学、科研领域的科技论文。主要栏目有：基础医学、公共卫生学、法医学、口腔医学、医学心理学、临床医学、护理学、技术方法等。

作者请从网上投稿，省级以上基金稿件请注明基金项目、名称和批准号，并附相关单位证明及作者简介。基金项目论文将优先发表。

本刊为双月刊，A4 开本，144 页，10 元/册，全国各地邮局订阅。国内统一刊号：21 – 1227/R，国际标准期刊号：0258 – 4646。CODEN 码：ZYDXEN。国内邮发代号：8 – 175，国际邮发代号：BM904。

《中国医科大学学报》热忱欢迎国内外医疗、科研人员踊跃投稿，积极订阅。

《中国医科大学学报》主页：http://journal.cmu.edu.cn

地　址：沈阳市和平区北二马路 92 号　　邮　编：110001　　电　话：（024）23250375