论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0488-04

巯乙磺酸钠单独及联合环丙沙星抗大肠杆菌生物膜的作用

陈 盛[1],余加林[1],罗则佳[2],何念海[3],孙凤军[4] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿科[1];610083 成都,成都军区总医院医务部[2];400038 重庆,第三军医大学西南医院:儿科[3],药学部[4])

[摘要] **目的** 研究巯乙磺酸钠(Mesna)对大肠杆菌生物膜(biofilm,BF)形成的影响,以及单独及联合环丙沙星(ciprofloxacin,CIP)对大肠杆菌BF的作用。**方法** 琼脂平板稀释法检测Mesna、CIP的最低抑菌浓度,扫描电镜观察Mesna对大肠杆菌BF形成的作用,平板计数法检测Mesna单独及与CIP联用后BF内活菌数,用激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy,CLSM)观察Mesna对已形成的大肠杆菌BF空间结构的影响并结合BF图像结构分析软件(image structure analyer,ISA)定量分析BF结构参数。**结果** Mesna能减少BF中基质样物质以及被膜的厚度;单用Mesna(8 mg/ml)才能使BF中的活菌数减少($P<0.05$),单用CIP 1MIC才可使BF中活菌数降低($P<0.05$),小剂量Mesna(1 mg/ml)与1/2 MIC的CIP联合应用就可使BF上的活菌数明显减少($P<0.05$);CLSM图像显示经Mesna作用后的BF厚度逐渐减少,密度逐渐稀疏;ISA软件定量分析显示:5 mg/ml Mesna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($P<0.05$),2 mg/ml Mesna干预后,效应不如高浓度明显。**结论** Mesna能够抑制大肠杆菌BF形成,破坏成熟大肠杆菌BF形态结构;Mesna与环丙沙星存在协同作用,增强其杀菌能力。

[关键词] 大肠杆菌;生物膜;巯乙磺酸钠;环丙沙星

[中图法分类号] R378.21;R969.4;R978 [文献标志码] A

Effects of mesna alone or combined with ciprofloxacin on *Escherichia coli* biofilm

Chen Sheng[1], Yu Jialin[1], Luo Zejia[2], He Nianhai[3], Sun Fengjun[4] ([1]Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]Department of Medical Administration, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083; [3]Department of Pediatrics, [4]Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of mesna on the formation of *Escherichia coli* biofilm (BF), and to study the effects of mesna alone and mesna combined with ciprofloxacin on *E. coli* BF. **Methods** Agar dilution method was used to detect the minimum inhibitory concentrations (MIC) of mesna and ciprofloxacin (CIP) and the numbers of bacteria in the BF treated with mesna alone and mesna combined with CIP. The formation of *E. coli* BF was observed by scanning electron microscopy (SEM), and the BF structure was observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The parameters of BF structure were quantitatively analyzed by an image structure analyzer (ISA). **Results** The SEM results showed that the mucoid material in the BF and the thickness of the BF were significantly reduced by mesna. The single use of mesna 8 mg/ml or CIP 1 MIC could significantly reduce the number of viable bacteria in BF ($P<0.05$), while mesna 1 mg/ml combined with CIP 1/2 MIC could achieve the same effect ($P<0.05$). CLSM results showed that the BF was thinner and more scattered in the mesna group than in the control group. ISA results showed that with the treatment of mesna 5 mg/ml, the thickness, average diffusion distance (ADD) and textual entropy (TE) of the BF decreased significantly ($P<0.05$), and the areal porosity (AP) of the BF increased significantly ($P<0.05$). The effects of mesna 2 mg/ml were not as significant as those of mesna 5 mg/ml. **Conclusion** Mesna can inhibit *E. coli* BF formation and affect its structure, and enhance the antibacterial activity of CIP, showing synergistic effects.

[基金项目] 国家自然科学基金(30772363, 81070513)

[通信作者] 余加林, E-mail: yujialin486@sohu.com

[**Key words**] *Escherichia coli*; biofilm; mesna; ciprofloxacin

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772363, 81070513). Corresponding author: Yu Jialin, E-mail: yujialin486@sohu.com

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是我国院内感染重要的条件致病菌,生物膜(biofilm,BF)形成是其耐药性增加的重要因素。BF 是单一或多种细菌为适应自然环境而形成的微菌落聚集物,它分泌的多糖蛋白复合物将细菌自身包裹其中,能阻止抗生素渗透到多糖包裹的细菌体内,导致对抗生素的强抵抗性和感染的迁延不愈[1]。因此如何抑制生物膜形成以及开发新的药物来加强抗生素对生物膜的作用引起了人们广泛的关注。

巯乙磺酸钠(Mesna)在临床上多将其作为黏液溶解剂[2]及泌尿系统保护剂[3],它是含有活性巯基(-SH)的化合物,可使痰液中糖蛋白多肽链的二硫键断裂,使糖蛋白分解,黏痰液化;同时对脱氧核糖核酸纤维也有裂解作用,黏液溶解作用较 N-乙酰半胱氨酸更强[4]。研究表明,化痰药 N-乙酰半胱氨酸干扰生物膜形成[5],Mesna 作为一种与 N-乙酰半胱氨酸有相似作用机制的临床用药,对大肠杆菌 BF 的形成是否有抑制作用,以及其能否联合抗生素,如环丙沙星(ciprofloxacin,CIP)清除已经形成的 BF,国内外尚少见相关报道。本研究将考察巯乙磺酸对大肠杆菌 BF 形成的影响及单独和联合环丙沙星对已形成的大肠杆菌 BF 的作用,为临床上治疗严重的大肠杆菌生物膜感染提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 大肠杆菌 ATCC 25922(第三军医大学西南医院药学部实验室保存)。

1.1.2 药品 巯乙磺酸钠标准品(SIGMA 公司,美国),盐酸环丙沙星标准品(重庆市药检所),荧光染色剂 SYTO9(激发波长 480 nm,发射波长 500 nm)。

1.1.3 培养基及试剂 L-Broth 培养基(升博生物制品公司)按说明配制,高温灭菌后 4 ℃保存备用。

1.1.4 仪器 激光扫描共聚焦成像系统(Leica 公司,德国),S-3400N 扫描电镜(SEM)(日本 HITACHI 公司,第三军医大学电镜室提供),比浊仪(德国 Siemens 公司),ISA 软件(美国 Montana 州立大学 Haluk Beyenal 教授提供),Amira5.2 三维重建软件(第三军医大学组织胚胎教研室提供),医用硅胶片(深圳市华丰利橡塑制品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Mesna 和 CIP 的最低抑菌浓度(MIC)测定 利用琼脂平板稀释法检测 Mesna、CIP 对大肠杆菌 ATCC 25922 的 MIC。

1.2.2 大肠杆菌 BF 体外模型建立[6] 挑取大肠杆菌 ATCC 25922 单菌落接种于 L-Broth 培养基中,37 ℃,180 r/min 振荡培养过夜。分光光度计测定菌液 D(600)值,调整 D(600)值至 0.5。分别吸取菌液 2 ml 加入 24 孔板(其内放 1 cm × 1 cm 玻片或硅胶片),37 ℃培养,每 12 小时换菌液 1 次,连续培养 48 h 即可形成稳定的 BF。

1.2.3 扫描电镜(SEM)观察 Mesna 对大肠杆菌 BF 形成的作用 按 1.2.2 方法在加入菌液的同时分别放入硅胶片,1 组加入 2 mg/ml Mesna 为预处理组,另 1 组加入相同体积的无菌生理盐水为对照组,48 h 后取出硅胶片用灭菌生理盐水多次充分漂洗,去除浮游菌。立即用 2.5% 戊二醛溶液固定 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,经系列处理后制备电镜标本进行扫描电镜(SEM)观察大肠杆菌 BF 微观形态。

1.2.4 菌落计数法检测 Mesna、CIP 单独及联合应用对大肠杆菌 BF 杀菌活性 按 1.2.2 方法得到稳定的 BF(以 1 cm × 1 cm无菌玻片为 BF 生长的载体),取出玻片用灭菌生理盐水多次充分漂洗取出浮游细菌,分别放入 24 孔平板中,根据测定的大肠杆菌菌株 MIC,以棋盘设计,将不同稀释度的 Mesna (0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/ml)和不同浓度的 CIP 两两组合,分别加入 24 孔平板中,37 ℃培养 24 h。经超声振荡脱膜(100 W,10 min)后,以使黏附的细胞脱落。最后将细胞悬浮液稀释到合适浓度,涂布于固体的 L-Broth 培养上,37 ℃培养 48 h 后计数[lg(cfu/cm^2)]。

1.2.5 激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察大肠杆菌 BF 经 Mesna 作用后形态 按 1.2.2 方法得到稳定的 BF(以 1 cm × 1 cm 无菌玻片为 BF 生长的载体),取出玻片放置 24 孔板中,分别加入 Mesna(浓度为 2、5 mg/ml),另 1 组加入相同体积的无菌生理盐水作为对照组,每组重复 6 孔。24 h 后用 PBS 洗去浮游菌,每张玻片生物膜表面滴加 20 μl 已配制好的荧光染液 SYTO9/PI,37 ℃避光孵育 15 min,1 ml 去离子水冲洗未结合荧光染色剂后,置 CLSM 观察。氩激光(488 nm)激发,分别采用绿色通道接收绿色信号,红色通道接收红色信号,物镜 × 100,由生物膜游离面向生物膜与玻片附着面逐层扫描(沿 Z 轴扫描),每组重复 3 张,每张取 3 个任意视野,每个视野扫描 10 ~ 16 层,获取图片堆,应用 Amira5.2 软件对图片堆进行 3 维重建。

1.2.6 ISA 软件分析 BF 结构参数 将 1.2.5 所获得图片调入 ISA3D 软件,设置参数后,运行 ISA 及 ISA3D 命令。运行结果包括:结构熵(textual entropy,TE)。平面参数(areal parameter):区域孔率(areal porosity,AP)、平均扩散距离(average difusion distance,ADD)。输出结果以 EXCEL 格式保存。

1.3 统计学方法

用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的均数比较采用一元方差分析,均数之间的多重

比较采用 Scheffe 方法(方差齐)或者 Tamhane 方法(方差不齐)进行。

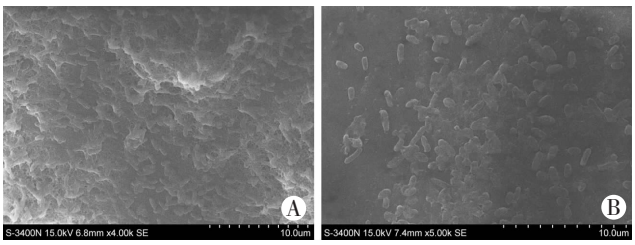
2 结果

2.1 MIC 检测结果

Mesna 对大肠杆菌 ATCC 25922 的 MIC 为 10 mg/ml,CIP 对大肠杆菌 ATCC 25922 的 MIC 为 0.25 μg/ml。

2.2 Mesna 对大肠杆菌 BF 形成的作用

对照组 BF 的 SEM 图像(图 1A)显示,杆状的细菌在硅胶片上成团状或膜状黏附生长,厚薄不均的黏液状物质连接成片状,细菌包裹其内;2 mg/ml Mesna 预处理组 SEM 图像(图 1B)显示,细菌之间的黏液样物质较对照组明显减少,被膜的厚度较薄,多数细菌散在分布,成团细菌群明显减少。



A:对照组(×4 000);B:巯乙磺酸钠 2 mg/ml 预处理组(×5 000)

图 1 大肠杆菌生物膜的超微结构观察 (SEM)

2.3 Mesna、CIP 单独及联合应用对大肠杆菌 BF 杀菌活性作用

单用 Mesna(8 mg/ml)才能使 BF 上的活菌数减少($P<0.05$);单用 CIP 的情况下,1 MIC 才可使 BF 上活菌数显著降低($P<0.05$)。小剂量 Mesna (1 mg/ml)与 1/2 MIC 的 CIP 联合应用就可使 BF 上的活菌数明显减少($P<0.05$)。说明Mesna对CIP 具有协同作用并呈一定的浓度依赖性,随着 Mesna 浓度的升高,各组 BF 内活菌数都呈下降趋势。见表 1。

表 1 不同浓度巯乙磺酸钠、环丙沙星单独及联合应用对大肠杆菌 BF 内活菌数的比较 [$\lg(cfu/cm^2)$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$]

巯乙磺酸钠	环丙沙星[最低抑菌浓度(MIC)]			
(mg/ml)	0	0.5	1.0	2.0
0.0	5.27±0.18	5.31±0.16	4.38±0.09^{b}	4.05±0.12^{b}
0.5	5.30±0.15	5.34±0.11	4.40±0.04^{b}	3.80±0.24^{b}
1.0	5.29±0.12	4.43±0.10^{ab}	4.02±0.10^{ab}	3.55±0.19^{ab}
2.0	5.27±0.13	4.19±0.21^{ab}	3.88±0.13^{ab}	3.20±0.21^{ab}
4.0	5.24±0.20	4.13±0.57^{ab}	3.74±0.15^{ab}	2.87±0.19^{ab}
8.0	4.67±0.39^{a}	3.96±0.32^{ab}	2.79±0.21^{ab}	2.47±0.37^{ab}

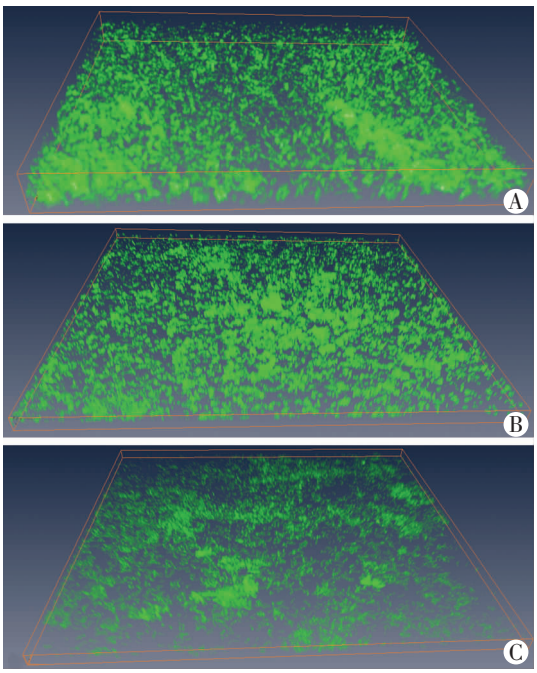
a:$P<0.05$,与 0 mg/ml 巯乙磺酸钠比较;b:$P<0.05$,与 0 MIC 环丙沙星比较

2.4 大肠杆菌 BF 经 Mesna 作用后 CLSM 图像

对照组(图 2A)的 BF 细菌较为密集,被膜形成大片状隆起;2 mg/ml Mesna 作用组(图 2B)生物被膜隆起的厚度逐渐减少,密度逐渐稀疏;5 mg/ml Mesna 作用组(图 2C)则更明显。

2.5 ISA 软件对大肠杆菌 BF 定量分析结果

将各组 BF 与进行 CLSM 扫描的图片输入 ISA 软件分析,得到 BF 结构的定量结果,如表 2 所示,Mesna 可使大肠杆菌 BF 厚度减小,AP 增加,ADD 减小, TE 减小,差异有统计学意义($P<0.05$),5 mg/ml 组作用更明显。



A:对照组; B: 巯乙磺酸钠 2 mg/ml 组; C: 巯乙磺酸钠 5 mg/ml 组;绿色为存活细菌经染色后发出的绿色荧光;图像长 112 μm ,宽 126 μm,A 图高 17 μm,B 图高 7 μm,C 图高 5 μm

图 2 巯乙磺酸钠对大肠杆菌生物膜作用的 CLSM 观察

表 2 生物膜模型各组各参数分析结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	厚度(μm)	AP	ADD(μm)	TE
巯乙磺酸钠 5 mg/ml 组	5.07±1.62^{a}	0.96±0.05^{a}	1.76±0.32^{ab}	3.85±0.36^{ab}
巯乙磺酸钠 2 mg/ml 组	7.25±2.15^{a}	0.92±0.07^{a}	2.33±0.18	5.05±0.21
对照组	18.11±2.43	0.72±0.06	2.78±0.40	5.26±0.30

a:$P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与巯乙磺酸钠 2 mg/ml 组比较

3 讨论

随着现代医学的发展,生物医学材料在临床上得以广泛应用,如心脏瓣膜置换、留置尿管、人工关节置换、动静脉导管、气管插管等,生物医学材料相关感染发生率随之增高。造成生物医学材料相关感染迁延不愈的主要原因是由于细菌黏附于材料表面形成 BF 所致,因此,抑制 BF 形成和破坏已形成的 BF 是现代微生物研究领域中的主要任务之一。

Mesna 是一种含巯基化合物,作为黏液溶解剂和泌尿系统保护剂,是一种疗效好而且安全的临床用药。本研究报道了 Mesna 在大肠杆菌 BF 形成和破坏已形成的大肠杆菌 BF 中的作用。研究发现,Mesna 对大肠杆菌存在抗菌作用,其 MIC 为 10 mg/ml,经亚抑菌浓度 Mesna 预处理的大肠杆菌,其 BF 形成能力降低,被膜的厚度明显变薄,这主要是因为 Mesna 所含活性巯基,

能使BF胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)中的重要组成成分之一的胞外蛋白多肽链的二硫键断裂,其所含磺酸基也是良好的溶解剂,有利于胞外蛋白的溶解。我们前期研究证实了Mesna显著减少了大肠杆菌BF的早期黏附及EPS的产生,成为Mesna抑制大肠杆菌BF的可能机制之一[7]。BF引起难治性感染的重要原因是单独抗生素给药并无法渗透入生物膜内部杀死细菌。本实验采用菌落计数法检测不同浓度环丙沙星与Mesna联合应用对BF中细菌的作用,结果显示它们具有协同抑制作用,且随着Mesna浓度的升高,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。这主要是因为Mesna破坏BF结构的完整性,增强了环丙沙星对BF渗透能力,从而提高了环丙沙星对BF中细菌的杀灭能力。在后面的研究中进一步证实了Mesna对大肠杆菌BF的破坏作用,我们通过激光共聚焦显微镜和ISA图像分析软件对Mesna作用前后的生物膜结构进行定性及定量化分析,发现Mesna可使大肠杆菌BF形态被破坏,BF厚度减小,BF的AP增加,ADD减小,提示生物膜变的稀疏、菌落间的孔道增加和营养供应距离缩短,这将有利于抗生素的渗透,并且利于生物膜内部细菌获得营养,从而对杀菌剂敏感性提高;TE减小,是反映生物膜的不均一性,减小说明生物膜不均一性降低,结构趋于简单,对外界的抵抗力减弱。由此我们认为,Mesna能抑制大肠杆菌BF形成,与其他抗生素联用可以提高其杀菌能力,破坏已形成的BF,为Mesna的抗BF的临床应用提供了理论基础。

Mesna抑制大肠杆菌BF的机制目前还不完全清楚。不过,已有学者探索了与Mesna类似的一些含巯基化合物抑制BF的机制,Olofsson等[5]研究了N-乙酰半胱氨酸干预包括铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌在内10种不同菌株,发现N-乙酰半胱氨酸抑制了铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌BF形成,并推测是由于N-乙酰半胱氨酸的活性巯基对细菌内含巯基的化合物如胱氨酸、谷胱氨酸发生竞争性抑制并非竞争性地抑制含有巯基酶的活性,从而影响到了BF的形成,Wu等[8]研究也发现半胱氨酸、β-巯基乙醇、二硫苏糖醇抑制金黄色葡萄球菌BF形成,证实主要是通过对胞内ica基因的抑制,从而抑制了胞内多糖黏附素PIA的产生,蛋白组学分析发现上述含巯基化合物还增强了胞内Embden-Meyerhof-Parnas途径与磷酸戊糖途径从而抑制与N-乙酰-D-氨基葡萄糖相关的多糖代谢的产生。除此之外,存在于大肠杆菌细胞周质的DsbA蛋白是重要的氧化还原酶,主要催化底物蛋白质二硫键的形成,其活性中心为Cys-Pro-His-Cys,研究发现,大肠杆菌dsbA基因的缺失可使鞭毛蛋白FlgI的二硫键错误折叠,抑制鞭毛相关基因(如flgC、flgL、flgH、flgI等),抑制与switch运动相关的基因(如fliC、fliT、motB等)及与趋化作用相关基因(如cheY、cheW、cheZ等)[9],减少大肠杆菌在膀胱上的定植[10],更为重要的是大肠杆菌丧失了生物膜形成能力[11]。Mesna作为含巯基化合物,是否影响到DsbA的活性中心从而抑制DsbA酶的活性,这将是我们今后研究的重点。总之,Mesna是如何影响大肠杆菌BF,是否与抑制BF形成的相关基因与蛋白代谢有关,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Donlan R M. Biofilms: microbial life on surfaces[J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 881-890.

[2] Denaro V, Di-Martino A, Longo U G, *et al*. Effectiveness of a mucolythic agent as a local adjuvant in revision lumbar spine surgery[J]. Eur Spine J, 2008, 17(12): 1752-1756.

[3] Ludwig U, Riedel M K, Backes M, *et al*. MESNA (sodium 2-mercaptoethanesulfonate) for prevention of contrast medium-induced nephrotoxicity - controlled trial[J]. Clin Nephrol, 2011, 75(4): 302-308.

[4] Tekeres M, Horvath A, Bardosi L, *et al*. Clinical studies on the mucolytic effect of mesna[J]. Clin Ther, 1981, 4(1): 56-60.

[5] 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.

[6] Cramton S E, Gerke C, Catz F. *In vitro* methods to study staphylococcal biofilm formation[J]. Methods Enzymol, 2001, 336: 239-255.

[7] 陈盛, 余加林, 何念海, 等. 巯乙磺酸钠对大肠杆菌生物膜早期黏附及胞外聚合物的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(24): 2554-2557.

[8] Wu X, Wang Y, Tao L. Sulfhydryl compounds reduce Staphylococcus aureus biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis[J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 316(1): 44-50.

[9] Dailey F E, Berg H C. Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in Escherichia coli[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(3): 1043-1047.

[10] Totsika M, Heras B, Wurpel D J, *et al*. Characterization of two homologous disulfide bond systems involved in virulence factor biogenesis in uropathogenic Escherichia coli CFT073[J]. J Bacteriol, 2009, 191(12): 3901-3908.

[11] Lee Y, Kim Y, Yeom S, *et al*. The role of disulfide bond isomerase A (DsbA) of Escherichia coli O157: H7 in biofilm formation and virulence[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 278(2): 213-222.

(收稿:2011-11-10;修回:2011-12-28)

(编辑 邓强庭)