论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1492-03

人工合成抗菌肽对大肠杆菌生物膜作用的初步研究

徐炎安,张 健,周爱国
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人工合成抗菌肽对大肠杆菌生物膜的影响。方法:采用试管法建立大肠杆菌生物膜,将大肠杆菌生物膜随机分成4个组A组:样本中加入4×MIC抗菌肽;B组样本中加入1×MIC庆大霉素;C组样本中联合加入4×MIC抗菌肽和1×MIC庆大霉素;D组样本中加入PBS液作为空白对照。处理6 h后对样本进行活菌计数,并利用扫描电镜观察比较处理组与对照组间差异。结果:6 h后活菌计数,C组与其他三组相比活菌数明显减少($P\leq0.05$);而A组和B组与D组间比较活菌数减少($P\leq0.05$)。扫描电镜观察可见A组与C组中生物膜内大肠杆菌的细胞膜完整性受到破坏。结论抗菌肽与庆大霉素联合运用时的杀菌效果显著增强。

【关键词】抗菌肽;庆大霉素;生物膜;大肠杆菌
【中国图书法分类法分类号】R378.2+1,R613 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-02-25

Preliminary study on the effect of synthetic antimicrobial peptides on *Escherichia coli* biofilm

XU Yan-an ,et al
(Department of Orthopaedics,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of synthetic antimicrobial peptides on *Escherichia coli* biofilm. *Methods*: The test tube method was used to establish the model of *Escherichia coli* biofilm. The samples were randomly divided into four groups: group A,by adding 4×MIC antimicrobial peptides to the samples,group B,by adding 1×MIC gentamicin to the samples,group C,by adding 4×MIC antimicrobial peptides and 1×MIC gentamicin to the samples,and group D,by adding phosphate buffered saline to the samples as a control. After 6 h the viable bacteria in the biofilm were counted following the method of colony count. The different changes in the biofilm were compared between the treated groups and the control group with scanning electron microscope. *Results*: The viable bacteria in group C were significantly decreased compared with the other three groups($P\leq0.05$). While compared with group D,the viable bacteria were decreased in group A and group B($P\leq0.05$). From the graph of scanning electron microscope the integrity of the *Escherichia coli* cell membrane was disrupted in group A and C. *Conclusion*: The results suggest that the killing effect of combination of antimicrobial peptides with gentamicin is significantly increased.

【Key words】 Antimicrobial peptides;Gentamicin;Biofilm;*Escherichia coli*

生物膜是相对于单个分散的浮游状态的细菌生存形式而言的一种独特的细菌生存形式。Costerton等将其定义为:附着于有生命或无生命物体的表面,被细菌分泌的胞外黏质物包裹的,具有高度组织化的多细胞群体结构[1]。生物膜的形成是目前临床上治疗材料相关性感染棘手的重要原因。研究表明杀灭大于48 h的生物膜抗生素剂量需高达5 000倍以上[2],而如此大剂量的抗生素是人体早已无法承受。抗菌肽作为一种新型抗菌药物因其具有抗菌谱广、杀菌机制独特且不易诱导耐药菌株的产生等特点而受到研究者的重视。目前国内外对抗菌肽在抗感染方面的研究主要集中在游离细菌,而将人工合成抗菌肽用于生物膜感染的治疗这一研究在国内外尚未见报道。本实验正是设想将抗菌肽运用于生物膜感染的治疗,初步研究其对生物膜的影响。

作者介绍:徐炎安(1983-),男,硕士,
研究方向:人工关节。
通讯作者:张 健,男,主任医师,E-mail: 68733235@sohu.com。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 人工合成抗菌肽(上海高科联合生物技术研发有限公司设计,上海生物工程技术服务公司采用固相合成多肽的方法人工合成);大肠杆菌ATCC25922(重庆医科大学微生物实验室提供);硫酸庆大霉素(SIGMA公司,

美国）；Luria-Bertani培养基（AMRESCO公司，美国）；MH肉汤（中国检验检疫科学研究院北京陆桥技术有限责任公司）；超声波清洗器（必能信超声有限公司）；扫描电镜（日本日立公司）；SUNRISE酶标仪（Tecan集团公司）；96孔微量板（corning公司，美国）

1.2 *方法*

1.2.1 人工合成抗菌肽抗菌活性的检测 利用Kirby-Bauer琼脂扩散法检测人工合成抗菌肽对于大肠杆菌抗菌活性。

1.2.2 合成抗菌肽与庆大霉素MIC（Minimum Inhibitory Concentration）和MBC（Minimum Bactericidal Concentrations）的测定 根据临床实验室标准化协会（Clinical and Laboratory Standards Institute，NCCLS）所制定方法测定MIC和MBC

1.2.3 大肠杆菌生物膜模型的建立以及检测

1.2.3.1 大肠杆菌生物膜模型的建立 将处理并灭菌好的盖玻片加入装有2 ml LB培养基的无菌试管中，并在每支试管中加入100 μl浓度为10^6 cfu/ml的大肠杆菌菌液，置于37℃培养箱培养；8 h后取出盖玻片并用无菌PBS液反复冲洗，洗去游离细菌，更换试管和LB培养基，继续培养。8 h后重复上述操作。共培养24 h大肠杆菌生物膜模型基本建立。

1.2.3.2 生物膜的检测 将建成的生物膜样本送扫描电镜（Scanning electron microscope）观察

1.2.4 合成抗菌肽与庆大霉素对大肠杆菌生物膜作用的检测

1.2.4.1 活菌计数 取24支试管，分成4个组其中A组中加入4×MIC的抗菌肽，B组中加入1×MIC的庆大霉素，C组中加入4×MIC的抗菌肽和1×MIC的庆大霉素，D组中加入无菌PBS液作为空白对照。取出已经建立完成的大肠杆菌生物膜模型，用无菌PBS液反复冲洗，洗去游离细菌，加入上述试管中。放入37℃培养箱作用6 h后，取出玻片用无菌PBS液反复冲洗，洗去残留的抗菌肽和庆大霉素，再放入装有2 ml无菌PBS液的试管中并置于超声波清洗器中进行超声清洗，将盖玻片上生物膜彻底清洗下来而不损伤细菌。混匀菌液，按照平板菌落计数法进行活菌计数。

1.2.4.2 扫描电镜观察 将未进行超声振荡的样本用无菌生理盐水反复冲洗后送扫描电镜观察，比较处理组与未处理组间的差异。

1.3 *统计学方法*

用SPSS11.5 for Window统计软件对实验数据进行统计分析，以$P\leq0.05$表示存在显著性差异。

2 结 果

2.1 *对E.coil抑菌环直径的测定*

纸片含药量均为9.2 μg，抗菌肽与庆大霉素对*E.coil*抑菌环的直径分别为17 mm和24 mm，而对照PBS纸片无抑菌环。

2.2 *抗菌肽与庆大霉素对大肠杆菌MIC和MBC的测定*

抗菌肽对于大肠杆菌的MIC为16 μg/ml，MBC为128 μg/ml；庆大霉素对大肠杆菌的MIC为1 μg/ml，MBC为8 μg/ml。

2.3 *生物膜的检测*

肉眼观培养24 h的盖玻片（经革兰染色）已经覆盖有一层物质，经扫描电镜发现该层物质为贴盖玻片上生长的大肠杆菌，基本将盖玻片全部覆盖，说明24 h即可以形成成熟的大肠杆菌生物膜，这与W.G.Pitt等[3]报道的一致。从图1扫描电镜图片可见，玻片上大肠杆菌生长并不一致，部分生长过快已有数层细菌覆盖，部分生长较慢，仅为单层细菌。

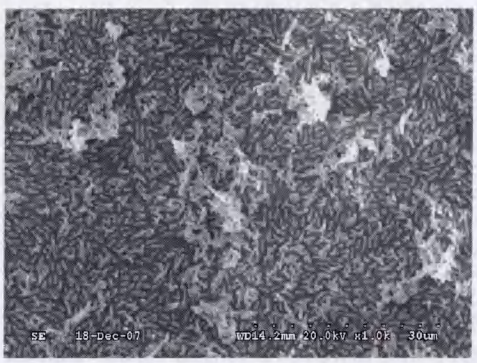


图1 大肠杆菌24 h生物膜（SEM，×1 000）

2.4 *抗菌肽和庆大霉素运用对于大肠杆菌生物膜作用的测定*

对表1的数据进行统计分析，A组和B组与D组间比较活菌数减少（$P<0.05$）；而C组与A组、B组和D组相比活菌数明显减少（$P<0.05$）。比较扫描电镜图2可以明显看出抗菌肽组和联合组中部分细菌的细胞膜完整性被破坏，而对照组中无此改变。

3 讨 论

随着近年来生物材料的广泛运用，材料相关性感染问题日益突出，生物膜的形成由于其阻止抗生素的传入与渗透[4]、细菌代谢缓慢[5]、特殊的生物膜表型[6]等原因导致细菌耐药性增强，难以清除。生物膜所致耐药性因此也越来越受到人们的重视。针对生物膜的治疗问题，国内外实验研究发现利用低频超声[7]，电磁场[8]以及直流电[9]等物理方法，发挥其生物波效应以及生物电效应，能够通过增强抗生素的杀菌效能。但是上述实验由于缺乏应用于人体的相关设备、部分处理因素对人体有害等原因难以运用到临床。因此，寻找一种有效可行的抗生物膜感染治疗方法具有极为重要的意义。抗菌肽作为一种新型的杀菌药物因为其独特的杀菌机理而成为研究细菌耐药的热点。研究显示抗菌肽不仅能杀灭革兰

表1 抗菌肽与庆大霉素合用对大肠杆菌生物膜中活菌数的影响 [lg (cfu/ml), $\bar{x}\pm S$]

分组	抗菌肽组(A 组)	庆大组(B 组)	联合组(C 组)	空白组(D 组)
例数	6	6	6	6
活菌数	$8.13 \pm 0.67^{*}$	$7.79 \pm 0.81^{*}$	$3.67 \pm 0.16^{**}$	8.77 ± 0.11

注:* 表示A组和B组与D组比较$P \leq 0.05$;** 表示C组与A、B、D3组比较$P \leq 0.05$



A. 抗菌肽组中*E.coil*生物膜内细菌改变SEM×5 000;B. 联合组中中E.coil生物膜内细菌改变SEM×5 000;C. 对照组中*E.coil*生物膜内细菌改变 SEM×4 000

图2 6 h后利用扫描电镜观察各组大肠杆菌生物膜内细菌形态改变

氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌,并且对病毒、原虫及癌细胞也有作用。

本实验利用试管法在体外成功建立大肠杆菌生物膜模型,并首次将人工合成抗菌肽运用到生物膜感染的研究,实验中发现在处理时间相同的情况下抗菌肽作用后的活菌数为8.13 ± 0.67,庆大霉素作用后的活菌数为7.79 ± 0.81,与对照组8.77 ± 0.11相比具有显著性差异($P \leq 0.05$)。结果显示抗菌肽和庆大霉素单独使用时对生物膜有一定的杀菌作用。Wieprecht T等[10]报道抗菌肽对游离细菌的杀灭作用是通过膜裂解机制实现的。从扫描电镜图片可以看出抗菌肽组和联合组中部分细菌的细胞膜完整性被破坏,而在对照组中细菌细胞膜无此改变。这提示抗菌肽对生物膜的杀菌机制也可能通过膜裂解实现的,但还需要进一步验证。

而联合用药组活菌数为3.67 ± 0.16与其他三组比较均具有显著性差异($P \leq 0.05$),这表明抗菌肽与小剂量庆大霉素联合运用时杀菌效能明显增强,与二者单独运用时相比杀菌效能增强10 000 ~ 30 000倍,说明抗菌肽与庆大霉素合用对生物膜具有协同作用。抗菌肽与庆大霉素单独运用杀菌能力较差,而联合运用作用却明显增强。这可能与抗菌肽破坏生物膜和大肠杆菌细胞膜结构的完整性,增强了庆大霉素对生物膜和细胞膜的穿透能力,提高庆大霉素对生物膜中细菌的杀灭能力有关,但具体机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Costerton J W,Stewart P S,Greenberg E P. Bacterial bioflms:a common cause of persistent infections[J]. Science,1999,284(5418):1318-1322.

[2] Khoury A E,Lam K,Ellis B,et al. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices[J]. ASAIO, 1992,38(3):M174-M178.

[3] Johnson L L,Peterson R V,Pitt W G. Treatment of bacterial biofilms on polymeric biomaterials using antibiotics and ultrasound[J]. Biomater Sci Polym Ed,1998,9(11):1177-1185.

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

[5] Duguid I G,Evans E,Brown M R,et al. Growth-rate-dependent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived Staphylococcus epidermidis, evidence for cell-cycle dependency[J]. Antimicrob Chemother,1992,30(6):791-802.

[6] Adams J L,Mclean R J.Impact of rpoS deletion on Escherichia coli biofilms[J]. Appl Environ Microbiol,1999,65(9):4285-4287.

[7] Carmen J C,Roeder B L,Nelson J L,et al. Treatment of biofilm infection on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics[J]. Am J Infection Control,2005,33(2):78-82.

[8] Benson D E,Grissom C B,Burns G L,et al. Magnetic field enhancement of antibiotic activity in biofilm forming Pseudomonas aeruginosa[J]. ASAIO,1994,40(3):M371-M376.

[9] Costerton J W,Ellis B,Lam K,et al. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotic in killing biofilm bacteria[J]. Antimicrob Agents Chemother,1994,38(12):2803-2809.

[10] Wieprecht T,Apostolov O,Beyermann M,et al. Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa:thermodynamic and mechanistic aspects[J]. Biochemistry,2000,39(2):442-452.

(责任编辑:冉明会)