

导管分离表皮葡萄球菌生物被膜形成能力相关研究*

邹自英,刘媛#,朱冰,吴丽娟[△],胡宗海,曾平

(成都军区总医院微生物免疫科,成都 610083)

摘要:目的 探讨导管分离表皮葡萄球菌的生物被膜形成能力和耐受应激环境能力。方法 采用结晶紫半定量法和细菌计数法检测表皮葡萄球菌的生物被膜形成能力和应激环境耐受能力。结果 表皮葡萄球菌 1457 菌株和 5 株导管分离菌株均具有生物被膜形成能力,菌株之间生物被膜形成能力差异无统计学意义($P>0.05$);导管分离菌株与 1457 菌株的游离细菌和被膜细菌的生长能力、对高分子材料的黏附能力、对过氧化氢的氧化应激耐受能力和对乙醇耐受能力差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 表皮葡萄球菌导管分离菌株与产生生物被膜的表皮葡萄球菌 1457 菌株具有相近的生物被膜形成能力和耐受应激环境能力。

关键词:葡萄球菌,表皮;氧化性应激;生物被膜

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)05-0626-02

Biofilm forming ability of staphylococcus epidermidis strains isolated from catheters*

Zou Ziying, Liu Yuan#, Zhu Bing, Wu Lijuan[△], Hu Zonghai, Zeng Ping

(Department of Microbial Immune, Chengdu Military Command General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: Objective To explore the biofilm forming ability and the ability to survive in stress environment of staphylococcus epidermidis strains isolated from catheters. **Methods** Semiquantitative biofilm assay and bacteria cell counting were performed to explore the biofilm forming ability and the ability to survive in stress environment of staphylococcus epidermidis strains. **Results** Staphylococcus epidermidis strain of 1457 and 5 clinical strains isolated from catheters had the similar ability of biofilm formation ($P>0.05$), similar growth ability of planktonic and biofilm cells, similar attachment ability to polystyrene, similar ability to survive in an oxidative and ethanol stress environment ($P>0.05$). **Conclusion** The biofilm forming ability and the ability to survive in stress environment of staphylococcus epidermidis strains isolated from catheters were similar to staphylococcus epidermidis 1457 strain.

Key words: staphylococcus epidermidis; oxidative stress; biofilm

表皮葡萄球菌是典型的生物被膜菌,它可以通过黏附在一些植入医疗器械表面形成生物被膜而造成持续性感染,具有迁延不愈的特征^[1-2]。表皮葡萄球菌的生物被膜不仅对抗菌药物具有非常强的抵抗能力,而且对机体免疫机制也具有非常强的适应能力,因而非常难以清除。本研究探讨导管来源表皮葡萄球菌形成生物被膜能力和耐受应激环境能力,为临床治疗由表皮葡萄球菌引起的导管相关性感染提供实验室依据,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 临床送检导管和血液培养同时检测出表皮葡萄球菌生长,导管分离株和血液培养分离株耐药表型一致的病例,选择导管分离菌株共计 5 株(SE1-5)。表皮葡萄球菌 1457 (SE1457)购自中国工业菌种保藏中心。

1.2 方 法

1.2.1 菌株鉴定 采用梅里埃公司的 VITEK2 COMPACT 全自动微生物分析仪和 GP 鉴定卡对细菌进行鉴定。

1.2.2 表皮葡萄球菌生物被膜半定量检测 参照文献^[1],调节菌液浓度使光密度(OD)₆₀₀ = 0.01,接种 96 孔板:200 μ L/孔,每组 4 孔,对照组为新鲜培养基,37 $^{\circ}$ C 24 h,200 μ L/孔 PBS 清洗 4 次。50 μ L/孔 Bouin 固定液固定 1 h,PBS 清洗 4

次,50 μ L/孔结晶紫染色 1 min。自来水清洗残余染料,室温晾干。用酶标仪读取波长 570 nm 的 OD 值。将测定组每孔测得值减去对照组平均值后即为测定组每孔最终值。

1.2.3 生物被膜细菌计数 调节菌液浓度使 OD_{600} = 0.01,接种 24 孔平板,37 $^{\circ}$ C 24 h。收集上清液到一个无菌试管。0.5 mL PBS 轻轻洗脱未黏附的细菌与上清液混合。再次加入 0.5 mL PBS,用平头牙签刮下被膜菌,收集到另一个无菌试管。上清液和生物被膜中的细菌分别进行计数。

1.2.4 表皮葡萄球菌的黏附能力 调节菌液浓度使 OD_{600} = 0.02,37 $^{\circ}$ C 培养直到 OD_{600} = 1.00,200 μ L/孔接种 96 孔平板,37 $^{\circ}$ C 1 h。200 μ L/孔 PBS 洗涤 4 次。50 μ L/孔 Bouin 固定液固定 1 h,再次以 PBS 清洗 4 次。50 μ L/孔结晶紫染色 1 min,自来水洗去残余染料,室温晾干。用酶标仪读取波长 570 nm 的 OD 值。将测定组每孔测得值减去对照组平均值后即为测定组每孔最终值。

1.2.5 氧化应激耐受实验 调节菌液浓度使 OD_{600} = 0.02,37 $^{\circ}$ C 培养直到 OD_{600} = 0.30。在一个无菌试管中加入 1.8 mL 菌液,然后加入 2 mol/L 的过氧化氢 0.2 mL 振荡混匀,室温静置 15 min,涂板计数,分别计数过氧化氢处理前后的细菌数,计

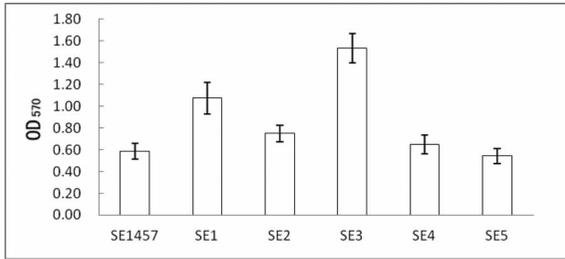
算存活率。

1.2.6 乙醇耐受实验 调节菌液浓度使 $OD_{600} = 0.02$, 37 °C 培养直到 $OD_{600} = 0.30$ 。在一个无菌试管中加入 2 mL 菌液, 然后加入无水乙醇 353 μ L 振荡混匀, 室温静置 15 min, 涂板计数, 分别计数乙醇处理前后的细菌总数, 计算存活率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

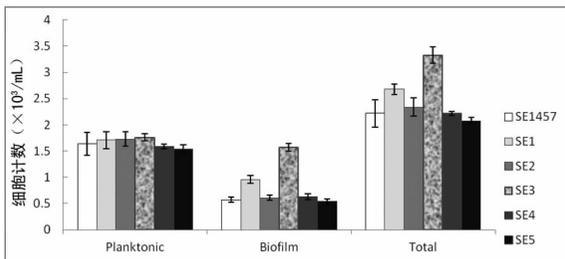
2.1 表皮葡萄球菌的生物被膜形成能力 表皮葡萄球菌 1457 和 5 株导管分离菌株均具有生物被膜形成能力, 菌株之间生物被膜形成能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。



SE1457: 表皮葡萄球菌 1457 菌株; SE1~SE5: 临床菌株 1~5 号。

图 1 不同菌株的生物被膜形成能力

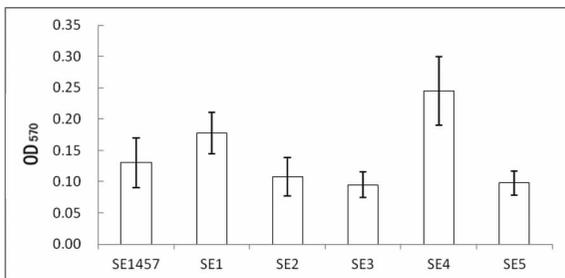
2.2 生物被膜细菌计数 为了比较不同菌株生物被膜形成能力差异是否是由于菌株的生长能力不同引起的, 分别对检测菌株的游离细菌和被膜细菌进行计数, 与 1457 菌株比较, 游离细菌和被膜细菌的生长能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。



SE1457: 表皮葡萄球菌 1457 菌株; SE1~SE5: 临床菌株 1~5 号; Planktonic: 浮游生长的细菌; Biofilm: 生物被膜细菌; Total: Planktonic 与 Biofilm 之和。

图 2 生物被膜细菌计数

2.3 菌株对高分子材料的黏附能力 与 1457 菌株比较, 临床菌株与 1457 菌株对高分子材料的黏附能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

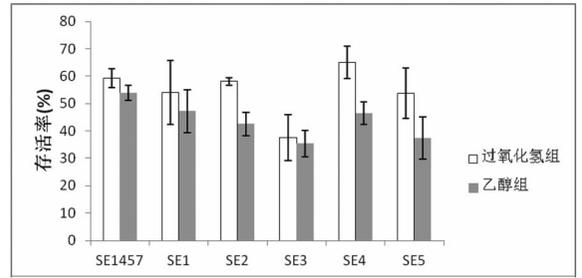


SE1457: 表皮葡萄球菌 1457 菌株; SE1~SE5: 临床菌株 1~5 号。

图 3 菌株对高分子材料的黏附能力

2.4 菌株氧化应激耐受能力和乙醇耐受能力 临床菌株与

1457 菌株对过氧化氢的氧化应激耐受能力和乙醇耐受能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4。



SE1457: 表皮葡萄球菌 1457 菌株; SE1~SE5: 临床菌株 1~5 号。

图 4 细菌氧化应激耐受能力和乙醇耐受能力

3 讨论

1457 菌株是能形成生物被膜的野生菌株, 通过与 1457 菌株进行对比分析, 可以了解临床菌株生物被膜形成能力的高低。同属葡萄球菌属, 金黄色葡萄球菌可以产生多种毒素致病, 而表皮葡萄球菌则主要通过在一些人工植入的医疗器械如深静脉置管、导尿管、人工瓣膜等表面形成生物被膜, 成为新的感染灶, 持续释放病原菌^[3-4]。本研究选取的 5 例均为导管和血液均检测出一致耐药表型的表皮葡萄球菌病例, 所选择的导管分离菌株均具有野生菌株 1457 的生物被膜形成能力。

表皮葡萄球菌分两个步骤形成生物被膜: (1) 黏附; (2) 通过增殖和合成黏性的细胞外基质, 形成多层细胞结构, 覆盖在植入物表面^[5]。因而生物膜形成能力的差异可能由黏附能力不同或增殖能力差异造成。本结果显示, 导管分离表皮葡萄球菌与 1457 菌株均具有对高分子材料相近的黏附能力和生长能力, 其生物被膜形成机制有待进一步研究。有研究报道, 多种基因分别在表皮葡萄球菌生物被膜形成的各个阶段发生作用, 如 *atlE*、*sdrG*、*embp* 基因在初始黏附过程中发挥重要作用^[6]; 而 *ica* 操纵子、*aap* 基因则参与被膜细菌的增殖^[7-9]。Agr 和 *luxS* 细菌数量感应系统也参与表皮葡萄球菌生物被膜的形成调控。

渗透压、乙醇、葡萄糖等环境条件均可以影响表皮葡萄球菌的生物被膜形成, 乙醇通过抑制 *icaR* 的转录从而刺激表皮葡萄球菌生物被膜形成, 而 ClpP 蛋白酶通常参与细菌对各种应激环境的适应机制^[10-12]。导管分离的 5 株表皮葡萄球菌与 1457 菌株均具有对强氧化剂过氧化氢和常用消毒剂乙醇的耐受能力, 其中是否有 ClpP 蛋白酶的参有待进一步的研究。

生物被膜阳性的表皮葡萄球菌能在静脉插上形成生物被膜, 通过形成感染灶持续性的脱落细菌入血, 侵犯机体, 有必要深入研究生物被膜阳性和生物被膜阴性细菌的致病能力差异和致病机制, 从而找到抑制表皮葡萄球菌生物被膜形成的可能药物靶标。

参考文献:

[1] Li M, Wang X, Gao Q, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China [J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(5): 456-461.
 [2] 陈颖, 雷玉洁, 黄云超, 等. 聚集相关蛋白(下转第 630 页)

- mong men from Montreal, Canada[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(30):2105-2109.
- [3] Tiwana J, Ortman S, Davies T, et al. Long-standing diabetes and its effects on outcomes in colon cancer[J]. *ASCO Meet Abstr*, 2011, 29:e14019.
- [4] Zhang R, Xu GL, Li Y, et al. The role of insulin-like growth factor 1 and its receptor in the formation and development of colorectal carcinoma[J]. *J Intl Med Res*, 2013, 41(13):1228-1235.
- [5] Vinikoor LC, Long MD, Keku TO, et al. The association between diabetes, insulin use, and colorectal cancer among Whites and African Americans[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(4):1239-1242.
- [6] Jamal MM, Yoon EJ, Vega KJ. Diabetes mellitus as a risk factor for gastrointestinal cancer among American veterans. Diabetes mellitus as a risk factor for gastrointestinal cancer among American veterans[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(42):5274-5278.
- [7] Kuriki K, Himse K, Tajima K. Diabetes and cancer risk for all and specific sites among Japanese men and women[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2007, 16(1):83-89.
- [8] Nowara E, Huszno J, Katarzyna DR, et al. The prospective estimation of blood serum free IGF-1, insulin concentration, and body mass index as a prognostic factor for breast cancer patients[J]. *ASCO Meet Abstr*, 2013, 31:e13201.
- [9] Autier P, Koechlin A, Robertson C, et al. Breast cancer and diabetes[J]. *ASCO Meet Abstr*, 2013, 31:e12507.
- [10] Friberg E, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes and risk of endometrial cancer: a population-based prospective cohort study[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16(2):276-280.
- [11] Henning H, Johannes JF, Rikke K, et al. In situ phosphorylation of akt and ERK1/2 in rat mammary gland, colon, and liver following treatment with human insulin and IGF-1[J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39(7):623-640.
- [12] Djiogue S, Kamdje A, Vecchio L, et al. Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2013, 20(1):R1-17.
- [13] Xie L, Wang WQ. Weight control and cancer preventive mechanisms: role of insulin growth factor-1-mediated signaling pathways[J]. *Exp Biol Med*, 2013, 238(2):127-132.
- [14] Higash Y, Sukhanov S, Anwar A, et al. Aging, Atherosclerosis, and IGF-1[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012, 67(7):626-639.
- [15] Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, et al. Insulin-like growth factor(IGF)-1, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta regression analysis[J]. *Lancet*, 2004, 363(9418):1346-1353.
- [16] Wei EK, Jing M, Michael N, et al. A prospective study of C-peptide, insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor binding protein-1, and the risk of colorectal cancer in women[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(4):850-855.
- [17] Nardon E, Buda I, Stanta G, et al. Insulin-like growth factor system gene expression in women with type 2 diabetes and breast cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(6):599-604.
- [18] Gail E, Felicity EB, Bruce RW. Increased expression of both insulin receptor substrates 1 and 2 confers increased sensitivity to IGF-1 stimulated cell migration[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2009, 16(7):635-647.

(收稿日期:2014-09-23 修回日期:2014-11-01)

(上接第 627 页)

- 基因与转化生长因子 $\beta 1$ 对肺癌相关生物材料表皮葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 14(4):308-314.
- [3] Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, et al. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(4):e10026.
- [4] Hu J, Xu T, Zhu T, et al. Monoclonal antibodies against accumulation-associated protein affect EPS biosynthesis and enhance bacterial accumulation of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6):e20918.
- [5] 姜越, 张德纯. 表皮葡萄球菌生物膜形成机制及调控[J]. *中国微生物学杂志*, 2011, 23(11):1056-1057.
- [6] Vadyvaloo V, Otto M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices[J]. *Int J Artif Organs*, 2005, 28(11):1069-1078.
- [7] 刘瑾, 罗少锋. 血培养中表皮葡萄球菌与 *ica*, *mecA* 基因研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(3):524-525.
- [8] 汤琦, 袁兵, 黄云超, 等. 乳腺外科表皮葡萄球菌 *icaA*, *icaD* 及聚集相关蛋白基因对细菌生物膜形成的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28(2):244-249.
- [9] 龚凤云, 刘丽娜, 邢铭友, 等. 表皮葡萄球菌的耐药与生物膜的相关研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(1):20-23.
- [10] Mack D, Davies AP, Harris LG, et al. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387(2):399-408.
- [11] Wang C, Li M, Dong D, et al. Role of *clpP* in biofilm formation and virulence of *staphylococcus epidermidis*[J]. *Microbes Infect*, 2007, 9(11):1376-1383.
- [12] Wang C, Fan J, Niu C, et al. Role of *spx* in biofilm formation of *staphylococcus epidermidis*[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010, 59(2):152-160.

(收稿日期:2014-09-20 修回日期:2014-11-10)