

• 基础实验研究论著 •

铜绿假单胞菌群体感应 *lasI/rhlI* 基因对其生物被膜形成的影响*胡昌俊, 李德辉, 朱艮苗[△]

(重庆开县人民医院检验科 405400)

摘要:目的 分析铜绿假单胞菌群体感应系统 *lasI/rhlI* 基因对生物被膜形成的影响,探讨群体感应系统对生物被膜形成的调控机制。方法 采用结晶紫染色法分析铜绿假单胞菌标准株 PAO1 及其群体感应系统 *lasI/rhlI* 基因缺陷株 PA210($\Delta rhlI$)、PA214($\Delta lasI$)及 PA216($\Delta lasI/rhlI$)生物被膜的形成能力。结果 铜绿假单胞菌标准株 PAO1 能形成成熟的生物被膜,基因缺陷株 PA214($\Delta lasI$)可形成较薄的生物被膜,而 PA210($\Delta rhlI$)及 PA216($\Delta lasI/rhlI$)则不能形成生物被膜。结论 *lasI/rhlI* 基因缺陷可影响铜绿假单胞菌生物被膜形成,但 *rhlI* 基因对生物被膜形成的影响更为显著。

关键词:假单胞菌,铜绿; 生物膜; 基因表达调控,细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)14-1779-03

Effects of *lasI/rhlI* genes of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing system on biofilm formationHu Changjun, Li Dehui, Zhu Genmiao[△]

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Kaixian County, Zhongqing 405400, China)

Abstract: Objective To analyze the influence of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing system genes *lasI/rhlI* on bacterial biofilm formation, in order to explore the control mechanism of quorum-sensing system on the biofilm formation. **Methods** The formation ability of *Pseudomonas aeruginosa* standard strains PAO1 and quorum-sensing system *lasI/rhlI* genetic defect strains PA210($\Delta rhlI$), PA214($\Delta lasI$) and PA216($\Delta lasI/rhlI$) biofilm was analyzed by using crystal violet dyeing method. **Results** *Pseudomonas aeruginosa* standard strains PAO1 formed the mature biofilm, genetic defect strains PA214($\Delta lasI$) formed the thin biofilm, and PA210($\Delta rhlI$) and PA216($\Delta lasI/rhlI$) could not form biofilm. **Conclusion** *lasI/rhlI* genetic defects can affect the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, but *rhlI* gene influence more significant on the formation of biofilm.

Key words: *pseudomonas aeruginosa*; biofilms; gene expression regulation, bacterial

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)是常见的医院感染条件细菌,其在感染机体中常以生物被膜(biofilm, BF)的形式存在^[1]。细菌生物被膜是指粘附于黏膜或生物医学材料表面的细菌及由其分泌的多糖基质包裹形成的被膜状群体,与液相单个生长的浮游菌相比,该细菌群体对抗菌素表现出高度的不敏感和较强的免疫逃逸能力。PA 是典型的生物被膜感染菌,生物被膜的形成是该菌感染难以治愈的重要原因之一^[2]。因而探讨细菌生物被膜的形成及其调控机制,对临床抗感染具有重要意义。

在对 PA 群体感应系统(quorum-sensing, QS)的诸多研究中,已证实 QS 系统对 PA 生物被膜形成的调控作用^[3]。本研究 PA QS 系统信号分子合成基因 *lasI/rhlI* 缺陷株分析其对生物被膜形成的影响,为进一步阐明 QS 系统对生物被膜的调控机制提供了重要实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 标准株 PAO1 及 PAO1 的 QS 系统 *lasI/rhlI* 基因缺陷株 PA210($\Delta rhlI$)、PA214($\Delta lasI$)及 PA216($\Delta lasI/rhlI$)由河北科学院赠送。

1.2 器材与试剂 Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)、TE2000 倒置荧光显微镜(日本 NIKO)、HZQ-F160 振荡培养箱(哈尔滨东联公司)、6 孔组织培养板与 96 孔组织培养板(加拿大 JET)、LB 培养基与结晶紫(杭州天和微生物试剂公司)。

1.3 PA 生物被膜形态学分析 参照文献[4]方法在 6 孔组织培养板中放入一块无菌盖玻片,对标准株 PAO1 及 PAO1

的 QS 系统 *lasI/rhlI* 基因缺陷株 PA210($\Delta rhlI$)、PA214($\Delta lasI$)及 PA216($\Delta lasI/rhlI$)进行生物被膜体外培养。待生物被膜成熟后,滴加 0.1%结晶紫染色,在高倍镜下观察生物被膜形态。

1.4 PA 生物被膜定量分析 根据文献[4-6]方法对生物被膜进行定量检测。在 96 孔无菌组织培养板中对标准株 PAO1 及 PAO1 的 QS 系统 *lasI/rhlI* 基因缺陷株 PA210($\Delta rhlI$)、PA214($\Delta lasI$)及 PA216($\Delta lasI/rhlI$)进行生物被膜体外培养,对成熟生物被膜进行结晶紫染色,再以 95%乙醇脱色。酶标仪检测脱色液在 570 nm 波长的吸光值(A_{570})。每个菌做 3 个复孔,对照空白不加菌。每个菌的 A_{570} 值平均值减去对照孔 A_{570} 值的平均值。 A_{570} 值的高低反映了生物被膜的厚度及成熟度,即各菌株的生物被膜形成能力。

1.4.1 PA 生物被膜定量培养 本实验根据目的要求进行了适当改进。具体方法如下:将上述菌株分别接种在 LB 液体培养基中过夜培养;取过夜培养的菌液 0.5 mL,用细菌标准比浊管调节菌液浓度为 0.5 麦氏单位,分别取 150 μ L 接种于 96 孔无菌组织培养板中,37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后换液,37 $^{\circ}$ C 再培养 20 h 后形成成熟的生物被膜。试验设空白对照,每株重复 3 孔。

1.4.2 PA 生物被膜定量检测 参照文献[4,7]方法对各菌株的生物被膜形成能力进行分析。依据各菌株生物被膜形成的量(即 A_{570} 值)按以下标准将其生物被膜形成能力分为 3 个等级: $A_{570} \leq 0.3$ 为不具有生物被膜形成能力,以“-”表示; $0.3 < A_{570} \leq 1.0$ 为生物被膜形成能力弱的,以“+”表示; $1.0 < A_{570}$ 为生物被膜形成能力较强的,以“++”表示。

2 结 果

2.1 PA 生物被膜形成能力的形态学分析 各菌株的生物被膜形态如图 1~4。图 1 为菌株 PAO1,可见形成完整、成熟生物被膜;图 3 为菌株 PA214,可见形成发育迟缓、较为松散的生物被膜;图 2、4 分别分别为菌株 PA210 及 PA216,可见细菌粘附或聚集成团,基本不能形成生物被膜。

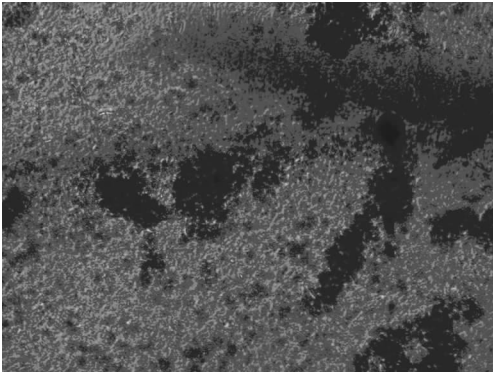


图 1 菌株 PAO1 生物被膜(放大倍数:10×60)

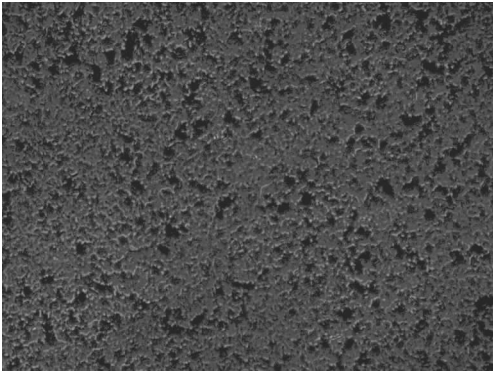


图 2 菌株 PA210 生物被膜(放大倍数:10×60)

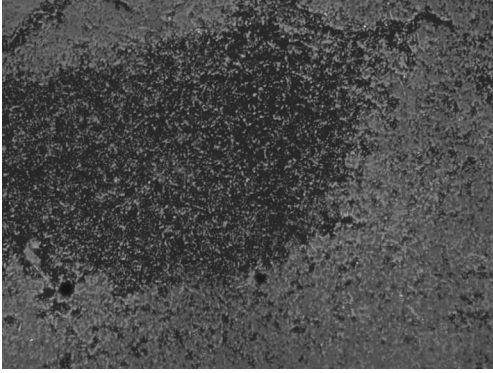


图 3 菌株 PA214 生物被膜(放大倍数:10×60)



图 4 菌株 PA216 生物被膜(放大倍数:10×60)

2.2 PA 生物被膜形成能力的定量分析 各菌株的生物被膜形成能力见表 1。所检测的 4 株 PA 中,标准株 PAO1 生物被膜形成最强为“++”,PA214 形成生物被膜能力相对较弱为“+”,而 PA210 及 PA216 不能形成生物被膜为“-”。

表 1 标准株 PAO1 与基因缺陷株的生物被膜定量分析结果

菌株	A ₅₇₀	生物被膜形成能力
PAO1	1.49	++
PA210	0.21	-
PA214	0.43	+
PA216	0.17	-

3 讨 论

PA 是典型的生物被膜菌,在弥漫性细支气管炎与囊性纤维化肺炎中常有 PA 生物被膜的形成,随着临床上生物医学材料的广泛使用,生物被膜相关 PA 感染也日益常见。生物被膜是指粘附于黏膜或生物医学材料表面的细菌及由其分泌的多糖基质包裹形成的被膜状群体。目前研究表明,PA 生物被膜的形成过程表现为:细菌浮游状态→粘附于固体表面,形成微菌落→微菌落之间相互粘连(形成生物被膜的初级结构)→“分化”为成熟的生物被膜(多糖基质进一步包裹微菌落)^[8]。

生物被膜菌与液相单个生长的浮游菌相比,对抗菌素表现出高度的不敏感和较强的免疫逃逸能力。该群体具有不同于浮游菌的独特耐药机制与多方面因素有关^[9]。一般认为细菌生物被膜可通过渗透限制机制、营养限制机制及耐药表型机制导致细菌耐药^[10],其机制为:(1)生物被膜中多聚糖所构成的分子屏障和电荷屏障(大多带负电荷)可阻止或延缓某些抗菌素渗入,这是渗透限制的主要机制。(2)由于生物被膜渗透限制的存在,营养物质不易通过生物被膜,而使生物被膜内营养缺乏,使内层细菌生长速度减慢,内层的细菌所处的这种缓慢生长状态也称饥饿状态,饥饿状态的细菌对抗菌素的敏感性降低。(3)此外,研究还发现耐药性的形成与某些生物被膜表型相关基因表达差异有关,这提示生物被膜耐药性的形成可能还存在耐药表型机制。由于生物被膜与细菌耐药及其他生物学性状密切相关,因此,研究生物被膜及其调控机制具有重要的临床意义。

研究已证实 QS 系统在生物被膜形成的过程中发挥了重要的调控作用。PA 中 QS 系统主要有 *lasI/lasR*、*rhlI/rhlR* 两个信号系统, *lasI*、*rhlI* 与 *lasR*、*rhlR* 基因分别编码不同的信号分子合成酶(合成信号分子)与信号分子受体。其对生物被膜的调控机制为:细菌 QS 系统信号分子随着细菌密度的增加而分泌增加,当信号分子达到一定阈值时,与信号分子受体结合并激活相应的信号分子受体,激活的受体再激活生物被膜相关转录调节子,合成胞外多糖及藻酸盐等产物,使细菌聚集成生物被膜^[2,9]。

本研究采用平板培养法建立 PA 生物被膜的体外模型,部分模拟了该菌在感染机体的生存环境,并根据文献[4-7]资料使用平板培养—结晶紫染色的方法,分析 QS 系统信号分子基因 *lasI* 及 *rhlI* 的缺陷对生物被膜形成能力的影响。结果显示,PA 生物被膜形成能力的形态学分析及定量分析结果一致。PAO1 为 QS 系统的标准株,可形成肥厚、分化良好、多聚糖包裹充实、完整成熟的生物被膜;PA214(Δ *lasI*)为 PAO1 的 QS 系统 *lasI* 基因的缺陷株,形成生物被膜能力较弱,形成发育迟缓、较为松散、尚处在微菌落相互聚集阶段的不成熟的

生物被膜;而 PA210($\Delta rhII$)为 PAO1 的 QS 系统 *rhII* 基因的缺陷株及 PA216($\Delta lasI/rhII$)为 PAO1 的 QS 系统 *lasI/rhII* 基因的缺陷株,菌体只粘附或形成微小菌落,基本上不能形成生物被膜。结果表明 QS 系统 *lasI/lasR*、*rhII/rhIR* 两个信号系统,均参与对生物被膜形成的调控,这与相关文献报道一致^[3]。但本研究首次证实,在 QS 系统对生物被膜形成的调控作用中,*rhII/rhIR* 系统作用更为显著,在 *rhII* 基因缺陷株中基本不能形成生物被膜。这为进一步研究 QS 系统对生物被膜的调控作用与机制提供了重要依据。

研究表明 QS 系统对生物被膜的形成发挥着重要调控作用,而生物被膜的形成又与细菌耐药的产生密切相关^[10]。因此干扰 QS 系统、抑制生物被膜形成的理论依据已使 QS 系统成为当今细菌耐药及其相关基因调控研究的重要靶点,这为治疗 PA 感染的药物研制带来了重要启发^[11]。现已发现许多化学物质能抑制 PA QS 系统功能,诸如:大蒜提取物、卤代呋喃酮、葡萄柚汁均能抑制 QS 系统,阻断细菌生物被膜形成^[12]。可见利用 QS 系统抑制剂,抑制生物被膜的形成,提高药物敏感性,可用于临床抗感染治疗及其药物研究;深入研究 QS 系统基因对生物被膜的调控机制、探索 QS 系统的调控靶点,对细菌耐药研究及其 QS 抑制剂的临床运用意义深远。

参考文献

[1] Dickschat JS. Quorum sensing and bacterial biofilms[J]. Nat Prod Rep, 2010, 27: 343-369.
[2] Byrd MS, Pang B, Hong WZ, et al. Direct evaluation of Pseudomonas aeruginosa biofilm mediators in a chronic infection model [J]. Bacterial Infections, 2011, 79: 3087-3095.
[3] de Kievit TR. Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa bio-

films[J]. Environ Microbiol, 2009, 11(2): 279-288.
[4] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation [J]. J Microbiol Methods, 2000, 40(2): 175-179.
[5] Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with cystic fibrosis[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 1915-1922.
[6] 杨维青, 刘晓峰, 黄震. 铜绿假单胞菌临床菌株生物被膜的定量分析[J]. 中国抗菌素杂志, 2009, 34(3): 181-183.
[7] Yang W, Shi L, Jia WX, et al. Evaluation of the biofilm-forming ability and genetic typing for clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa by enterobacterial repetitive intergenic consensus-based PCR [J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(12): 1057-1061.
[8] Ghafoor A, Hay ID, Bernd HA, et al. Role of exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and architecture[J]. Physiology, 2011, 77: 5238-5246.
[9] 朱良苗, 杨维青. 群体感应系统对细菌耐药的调控作用[J]. 中国抗菌素杂志, 2011, 36(1): 7-10.
[10] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents [J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(2): 114-122.
[11] Ding X, Yin B, Qian L, et al. Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of Pseudomonas aeruginosa biofilm[J]. J Med Microbiol, 2011, 60: 1827-1834.
[12] Girenavar B, Cepeda ML, Soni KA, et al. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 125(2): 204-208.

(收稿日期: 2013-02-08)

(上接第 1778 页)

力有较大增加,但都不如 20 mW/cm² 组增加显著。辐射 3 d 后,ALT、AST、GGT 均有显著性差异($P < 0.05$),其余时间点检测结果均无显著性差异。肝功中 ALT、AST、GGT 3 项指标通常用于评价肝的损伤程度,相应指标的升高与肝功能的损伤成正相关。三者的变化反映出经过长时间的电磁辐射后,小鼠肝脏受到一定程度的影响。

3 讨 论

本实验方法采用随机、平行、独立的动物实验方法,系统地研究了 10 mW/cm² 和 20 mW/cm² 两个功率密度的电磁辐射对小鼠外周血象和肝功能的影响^[3]。为使实验结果具有良好的稳定性和可重复性,实验过程中的小鼠共同分笼饲养、辐射,并采集小鼠尾静脉血进行检测,以排除因感染、疾病、焦虑等因素对血象和肝功能指标的影响^[4]。同时为了排除热效应的干扰,本实验采用间断暴露的方法,即辐射 20 min 间歇 5 min,本次实验共间歇 15 min。再测量小鼠肛温,辐射前后小鼠体温的升高低于 1 ℃ 以证实此方法可排除热效应的干扰^[5]。

我们的研究表明,低功率密度的电磁辐射会引起机体血细胞数量和肝功能指标的变化,低功率密度电磁辐射对小鼠血象和肝的影响主要表现在白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT);丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)数量变化。实验结果还表明,在一定功率密度范围内,低剂量电磁辐射对机体损伤效应与功率密度呈正相关,该研究中 20 mW/cm² 对结果的影响高于 10 mW/cm²,提示电磁辐射的强度对人体的伤害呈正相关。这个结果

与国内外的科学研究相类似:长期处于电磁辐射环境下,还可能会造成儿童白血病、诱发癌症并加速人体的癌细胞增殖,影响人的生殖系统导致儿童智力残缺,影响人们的心血管系统和视觉系统^[6]。本课题的结果表明了及时低剂量的电磁辐射也对生物体存在着影响。因此,在电磁辐射的防护中同样应该重视低剂量电磁辐射的预防。

参考文献

[1] 高艳, 张成岗. 生物电磁剂量学研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2010, 11(2): 1286-1289.
[2] Luo H, Chu W, Wan Z, et al. Effects of 900 MHz electromagnetic radiation on ultrastructure of rats' hippocampal neural stem cells in vitro[J]. Med J Chin PLA, 2012, 37(4): 313-317.
[3] 周振, 姜秉成, 童建, 等. 900 MHz 电磁辐射对小鼠自发活动昼夜节律的影响[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(11): 680-683.
[4] 赵慧军, 徐晓鸿. 高压变电站电磁辐射对小鼠血液、肝功能的影响[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(21): 4827-4829.
[5] Liu C, Duan W, Xu S, et al. Exposure to 1800 MHz radio frequency electromagnetic radiation induces oxidative DNA base damage in a mouse spermatocyte-derived cell line[J]. Toxicol Lett, 2013, 218(1): 2-9.
[6] 王伟, 王德文. 电磁辐射对免疫损伤的研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(12): 966-968.

(收稿日期: 2012-11-06)