

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20233382

· 论 著 ·

三种表面活性剂对表皮葡萄球菌生物膜渗透性及成膜关键基因 *agr* 表达的影响

石晶金¹, 方溢文², 官 妍²

(1. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院医务科, 上海 200030; 2. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012)

[摘要] **目的** 通过探究三种类型表面活性剂(十二烷基羟丙基磺基甜菜碱、十二烷基苯磺酸钠、溴化十六烷基吡啶)分别对表皮葡萄球菌(*Se*)生物膜渗透性及成膜关键基因——附属基因调节子(*agr*)表达的影响,为临床利用表面活性剂控制由 *Se* 生物膜引起的相关感染提供依据。**方法** 建立 *Se* 生物膜渗透模型,检测经表面活性剂处理后对生物膜渗透性的影响;选择在不同时间段,观察三种表面活性剂对悬浮状态下产膜 *Se* 的 *agr* 转录水平的影响,从分子水平评估表面活性剂对产膜 *Se* 黏附及毒力等可能的作用。**结果** 三种类型表面活性剂在最低抑菌浓度(MIC)分别为 2、1、1/2 浓度时,均明显影响 *Se* 生物膜的渗透性($P < 0.001$),增强药物对生物膜的渗透作用。与阴性对照组比较,十二烷基羟丙基磺基甜菜碱在 0.5、4、12 h 时间段,对 *agr* 表达有显著上调作用($P < 0.001$);十二烷基苯磺酸钠在 0.5、4、24 h 时间段,对 *agr* 表达有显著下调作用($P < 0.001$),在 12 h 时间段对 *agr* 表达有显著上调作用($P < 0.001$);溴化十六烷基吡啶在 0.5 h 时间段对 *agr* 表达有显著上调作用($P < 0.01$),在 12、24 h 时间段,对 *agr* 表达有显著下调作用($P < 0.001$)。**结论** 三种不同类型的表面活性剂对 *Se* 生物膜渗透作用均有较强的影响,在不同时间段对 *agr* 表达有显著调节作用,因而可能在 *Se* 生物膜的形成、防止感染的扩散并导致细菌毒力减弱等方面发挥作用。

[关键词] 表面活性剂;表皮葡萄球菌;生物膜;渗透性;*agr*

[中图分类号] R378.1⁺1

Effect of three surfactants on the permeability of *Staphylococcus epidermidis* biofilm and the expression of key biofilm-forming gene *agr*

SHI Jing-jin¹, FANG Yi-wen², GUAN Yan² (1. Department of Medical Affair, International Peace Maternity and Child Health Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 2. School of Integrative Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of three surfactants (dodecyl hydroxypropyl sulfobetaine, sodium dodecylbenzene sulfonate and cetyl pyridine bromide) on the permeability of *Staphylococcus epidermidis* (*Se*) biofilm and the expression of the key biofilm formation gene *agr*, and provide reference for the clinical use of surfactants to control *Se* biofilm relevant infection. **Methods** *Se* biofilm permeability model was constructed to detect the effect of surfactant treatment on biofilm permeability. The effect of three surfactants on *agr* transcription in biofilm-forming *Se* in the suspension state was observed at different time periods, and the possible effect of surfactants on the adhesion and virulence of biofilm-forming *Se* was assessed at molecular level. **Results** All three types of surfactants significantly affected the permeability of *Se* biofilm at minimum inhibitory concentration (MIC) of 2, 1, and 1/2 ($P <$

[收稿日期] 2022-09-19

[基金项目] 上海市青年科技英才扬帆计划(21YF1451600);安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2019A0433);上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院院级课题(YN201806)

[作者简介] 石晶金(1991-),女(汉族),江苏省宿迁市人,助理研究员,主要从事医院感染管理研究。

[通信作者] 官妍 E-mail: guanyan0726@sina.com

0.001), enhancing drug permeability to biofilm. Compared with negative control group, dodecyl hydroxypropyl sulfobetaine had a significant up-regulation effect on *agr* expression at 0.5, 4 and 12 hours ($P < 0.001$). Sodium dodecylbenzene sulfonate had a significant down-regulation effect on *agr* expression at 0.5, 4 and 24 hours ($P < 0.001$) and a significant up-regulation effect at 12 hours ($P < 0.001$). Cetyl pyridine bromide had a significant up-regulation effect on *agr* expression at 0.5 hours ($P < 0.01$) and a significant down-regulation effect at 12 and 24 hours ($P < 0.001$). **Conclusion** All three surfactants had strong effects on the permeability of Se biofilm, with significant modulating effect on *agr* expression at different time periods, which may play a role in the formation of Se biofilm, thus preventing the spread of infection and leading to the reduction of bacterial virulence.

[Key words] surfactant; *Staphylococcus epidermidis*; biofilm; permeability; *agr*

表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, Se) 是生物材料植入相关医院感染的重要致病菌之一, 在假体植入、骨关节置换、中心静脉导管置入、手术部位缝合等医源性感染灶中检出率较高。细菌生物膜 (biofilm) 是指细菌黏附于惰性或活性的实体表面, 通过自身分泌的胞外黏质物 (extracellular polymeric substance, EPS) 将其包裹, 形成具有高度组织化的多细胞细菌群体结构^[1]。Se 作为凝固酶阴性的葡萄球菌, 能否形成细菌生物膜是目前评判其是否具有致病性的最重要指标^[2-3]。

Se 感染问题难以处理的主要原因是由于有生物膜的保护。Se 生物膜形成机制已基本明确, 大致分为下面两个动态过程: (1) Se 表面的疏水性蛋白或多糖胞间黏附素 (polysaccharide intercellular adhesion, PIA) 在生物材料表面进行初始附着, 形成细菌群落; (2) Se 间通过 PIA 介导相互聚集, 形成生物膜^[4]。在细菌初始的附着阶段, 自溶素 (autolysin)、膜多糖黏附素 (cPSPA)、表面蛋白 (Ssp) 和纤维蛋白原结合蛋白 (Fbe) 等很多相关因子都参与其中。其中 AtlE 不仅参与生物膜初始阶段的形成, 并可能是导致生物膜相关感染的重要原因。附属基因调节子 (accessory gene regulator, *agr*) 通过调节 *atlE* 基因编码的自溶素 AtlE, 进而影响 Se 生物膜的形成。细菌从生物膜上分离, 是导致生物膜相关性疾病扩散的机制之一, 而 Se 的分散机制是由 *agr* 系统调控。目前已知影响细菌分散的主要因素涉及群体感应 (quorum sensing, QS) 系统、基质降解酶等。

表面活性剂可以抑制杀灭微生物的作用已被学界和业界广泛接受, 由于其具有亲水和疏水双重功效、带有电荷并可改变两相性质, 如果其在生物材料表面发生定向吸附, 则能大幅提高其抑菌效果, 进而可能阻止细菌的附着和成膜。细菌生物膜呈负电性, 表面活性剂通过破坏形成生物膜的 EPS 结构和

功能, 最终导致生物膜的瓦解。前期研究^[5-9] 也证实, 阳离子型表面活性剂 (溴化十六烷基吡啶)、阴离子型表面活性剂 (十二烷基苯磺酸钠)、两性离子型表面活性剂 (十二烷基羟丙基磺基甜菜碱) 等对产膜的 Se 黏附、代谢等均有抑制作用; 对已形成的生物膜亦有一定的清除效果。本研究通过观察三种表面活性剂在作用的不同时间段, 对悬浮状态下的产膜 Se 的 *agr* 基因 (与黏附、毒力、群体感应相关的关键基因) 转录水平的影响, 旨在从分子水平探究表面活性剂对 Se 生物膜形成过程的影响; 建立 Se 生物膜渗透模型, 探究表面活性剂处理生物膜后对其渗透性的影响, 为表面活性剂在抗 Se 生物膜方面的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基 Se 产膜标准菌株: ATCC 35984 (复旦大学基础医学院瞿涤教授馈赠); Se 不产膜标准菌株: ATCC 12228 (中国食品药品检定研究院)。MH 培养基、TSA 培养基、TSB 培养基 (杭州微生物试剂有限公司)。

1.2 药品与试剂 溴化十六烷基吡啶、十二烷基苯磺酸钠 (国药集团化学试剂有限公司), 十二烷基羟丙基磺基甜菜碱 (上海银聪新材料科技有限公司), 万古霉素标准品、红霉素标准品 (中国食品药品检定研究院), SYBR Green I RT-PCR 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 来源于宝生物工程 (上海) 有限公司, 其余所用试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 定量反转录 PCR (qRT-PCR) 仪 (美国赛默飞世尔), 凝胶成像系统 (Tanon), K3 型酶标仪 (LabServ), 核酸电泳系统 (Bio-Rad), 高速冷冻离心机 (日立公司), Waters Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱仪 [沃特世科技 (上海) 有限公司], 恒温摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.4 研究方法

1.4.1 三种表面活性剂、万古霉素对产膜 Se 的最低抑菌浓度 (MIC) 测定 采用连续稀释法将每支试管 MH 液体培养基中的表面活性剂及万古霉素终浓度分别达到 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 总体积为 2 mL; 向各试管中分别加入 0.5 麦氏单位的 ATCC 35984 菌液各 200 μL 。设置空白对照 (MH 液体培养基), 阴性对照 (含有菌液但不添加表面活性剂或万古霉素的 MH 培养基); 每组设置 2 个平行。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h, 与空白对照比较获得各表面活性剂及万古霉素的 MIC 值。

1.4.2 三种表面活性剂对 Se 的 *agr* 表达影响的测定

1.4.2.1 引物 结合美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 参考基因中 ATCC 35984 *agr* 和 *gryB* 的基因序列, 委托上海生工生物有限公司设计、合成基因引物序列, 见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 相关基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences for fluorescent quantitative PCR

引物名称	序列 (5'→3')	扩增片段大小 (bp)
<i>agr</i> -F	TGAGTTGTTGAGCCATCCCA	107
<i>agr</i> -R	ACGTAACACTGAGTCCAAGGAAACTA	
<i>gryB</i> -F	AGCGGTTTCGTAAAAGACCGGGTATG	108
<i>gryB</i> -R	CCTGCTAATGCCTCGTCAATAC	

1.4.2.2 菌细胞制备 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下, 将 2 mL 的 0.5 麦氏单位 ATCC 35984 菌液接种到 200 mL 的 TSB 液体培养基中培养, 当含菌培养基 OD₆₀₀ 达到 1.6 时即终止培养。将上述含菌培养基于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 30 min, 弃上清。以 200 mL 无菌新鲜的 TSB 培养基重悬菌细胞。

1.4.2.3 分组 A 组: 阴性对照 (不添加表面活性剂或万古霉素); B 组: 1 MIC 溴化十六烷基吡啶; C 组: 1 MIC 十二烷基苯磺酸钠; D 组: 1 MIC 十二烷基羟丙基磺基甜菜碱; E 组: 阳性对照 (1 MIC 万古霉素)。

1.4.2.4 药物处理后菌细胞的保存 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下, 将阴性对照及加入表面活性剂或万古霉素的各组菌液继续摇床培养; 分别在 0.5、4、12、24、48 h 等时段各取样 10 mL 并置于经 DEPC 水处理并灭菌 Ep 管中, 设置 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 条件下离心 8 min。弃上清后置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.2.5 转录水平 [实时定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)] 按 Omega 细菌 RNA 提取试剂盒的说明书, 提取各组表面活性剂或药物作用前后 Se 总 RNA; 经琼脂糖电泳鉴定后, 置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 完成实时定量 RT-PCR 测量 *agr* 基因的表达情况。将 *gryB* 作为内参基因, 每样本做三复孔。

1.4.2.6 qRT-PCR 结果计算 自动调节基线于适宜处, 各扩增曲线与阈值线的交叉点所对应的横坐标, 即为 *Ct* 值。根据标准曲线浓度与 *Ct* 值的对应关系, 可得出各待测标本的初始浓度。*agr/gryB* 的结果作为评价 *agr* 基因转录水平的指标。

将未经表面活性剂或万古霉素处理的 ATCC 35984 *agr* 基因在每个作用时间段的表达量视为 “1”, 并计算出各组的相对量。

1.4.3 三种表面活性剂影响 Se 生物膜渗透性的测定

1.4.3.1 构建生物膜渗透模型 先用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜将牛津杯一端封闭, 灭菌处理; 滤膜端向下放置在 TSA 培养基表面, 牛津杯内加入用 TSB 培养基稀释为 0.5 麦氏单位的 ATCC 35984 菌液 100 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 48 h, 建立 Se 生物膜渗透模型。取出渗透模型, 于牛津杯内加入以 TSB 培养基稀释的分别为 2、1、1/2 MIC 浓度的表面活性剂及万古霉素各 100 μL , 牛津杯外加适量 TSB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 24 h 后取出, PBS 缓冲液漂洗。

1.4.3.2 渗透率测定 于处理后渗透模型的牛津杯中加入 100 μL 以生理盐水稀释为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的红霉素溶液, 牛津杯外加 1 000 μL 生理盐水, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱静置 6、12 h 后分别测定牛津杯外红霉素浓度。(1) 抑菌圈法。根据前期研究方法^[10], 将无菌滤纸片 (大小、厚度与微生物药敏纸片一致, 实验室自制) 浸没于上述处理获得的渗透液中 5 min, 取出晾干备用。将 ATCC 12228 菌液调至 0.5 麦氏单位, 均匀涂布在 MH(A) 培养基上, 再将已经处理过的滤纸片放在培养基上, 倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱, 培养 18~20 h 后测量抑菌圈直径。渗透率 = 处理组抑菌圈直径 / 完全渗透组抑菌圈直径 $\times 100\%$ 。(2) 高效液相色谱法。采用 ACQUITY UPLC BEH 色谱柱, 设置检测波长为 205 nm, 进样量为 20 μL 。流动相采用 0.1 mol/L 磷酸二氢铵溶液 (三乙胺调节 pH 6.5) - 乙腈 (70:30); 流速 0.2 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。基于上述条件测得红霉素标准品溶液的色谱图, 红霉素的保留时间为 2.849 min。以上述条件及方法测得各组处理后牛津杯外红霉素渗透后浓

度。渗透率 = 处理组牛津杯外红霉素渗透后浓度 / 完全渗透组牛津杯外红霉素渗透后浓度 × 100%。

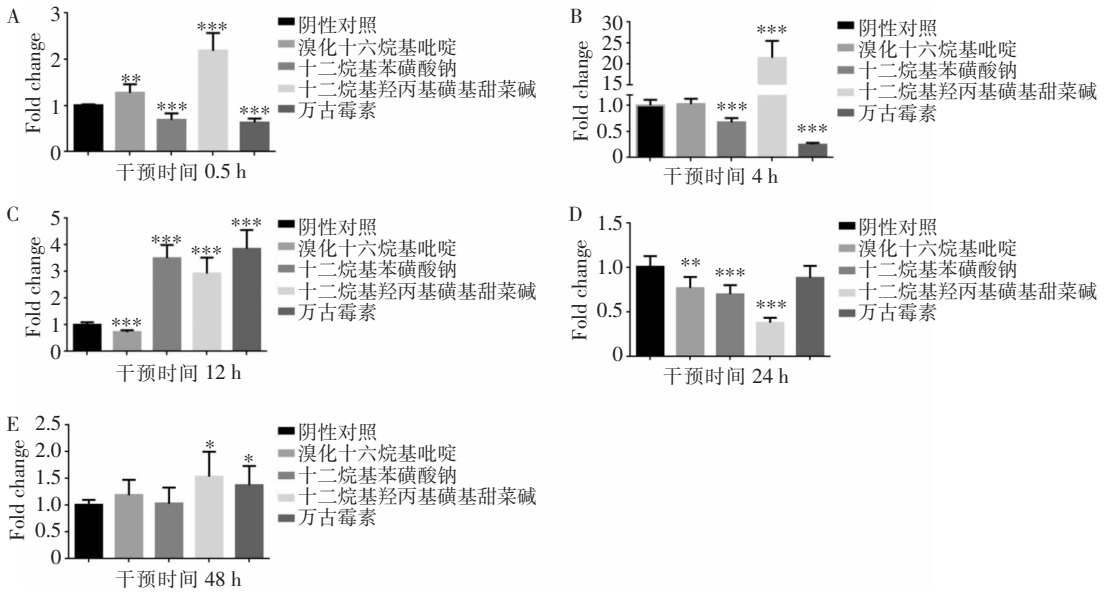
1.5 数据分析 应用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行比较。P ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三种表面活性剂、万古霉素对产膜 *Se* 的 MIC 测定 溴化十六烷基吡啶、十二烷基苯磺酸钠、十二烷基羟丙基磺基甜菜碱、万古霉素对 ATCC 35984

MIC 分别为 2、64、16、8 μg/mL。

2.2 三种表面活性剂对 *Se* 的 *agr* 表达影响的测定 与阴性对照组比较, 十二烷基羟丙基磺基甜菜碱在 0.5、4、12 h 时间段, 对 *agr* 表达有显著上调作用 ($P < 0.001$), 在 24 h 时间段对 *agr* 表达有显著下调作用 ($P < 0.001$)。与阴性对照组比较, 十二烷基苯磺酸钠在 0.5、4、24 h 时间段, 对 *agr* 表达有显著下调作用 ($P < 0.001$), 在 12 h 时间段对 *agr* 表达有显著上调作用 ($P < 0.001$)。与阴性对照组比较, 溴化十六烷基吡啶在 0.5 h 时间段对 *agr* 表达有显著上调作用 ($P < 0.01$), 在 12、24 h 时间段对 *agr* 表达有显著下调作用 ($P < 0.001$)。见图 1、表 2。



注: * 表示与阴性对照组比较, $P < 0.05$; ** 表示与阴性对照组比较, $P < 0.01$; *** 表示与阴性对照组比较, $P < 0.001$ 。

图 1 三种表面活性剂对 ATCC 35984 *agr* 表达的影响统计分析图

Figure 1 Effect of three surfactants on the expression of ATCC 35984 *agr*

表 2 三种表面活性剂与阴性对照、阳性对照组对 ATCC 35984 *agr* 基因转录水平的相对量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of three surfactants, negative and positive control groups on the relative quantity of the transcriptional level of ATCC 35984 *agr* ($\bar{x} \pm s$)

干预时间 (h)	溴化十六烷基吡啶	十二烷基苯磺酸钠	十二烷基羟丙基磺基甜菜碱	万古霉素	阴性对照
0.5	1.271 7 ± 0.186 4**	0.688 3 ± 0.143 0***	2.185 0 ± 0.384 3***	0.636 7 ± 0.080 7***	1.003 3 ± 0.019 7
4	1.025 0 ± 0.103 5	0.676 7 ± 0.081 4***	21.456 7 ± 4.061 9***	0.251 7 ± 0.031 9***	1.005 0 ± 0.100 5
12	0.721 7 ± 0.075 2***	3.506 7 ± 0.486 9***	2.926 7 ± 0.594 5***	3.856 7 ± 0.704 4***	1.001 7 ± 0.091 3
24	0.768 3 ± 0.123 8**	0.698 3 ± 0.102 1***	0.378 3 ± 0.054 2***	0.883 3 ± 0.134 0	1.005 0 ± 0.122 1
48	1.183 3 ± 0.286 9	1.023 3 ± 0.300 3	1.530 0 ± 0.463 9*	1.371 7 ± 0.356 5*	1.003 3 ± 0.090 7

注: * 表示与阴性对照组比较, $P < 0.05$; ** 表示与阴性对照组比较, $P < 0.01$; *** 表示与阴性对照组比较, $P < 0.001$ 。

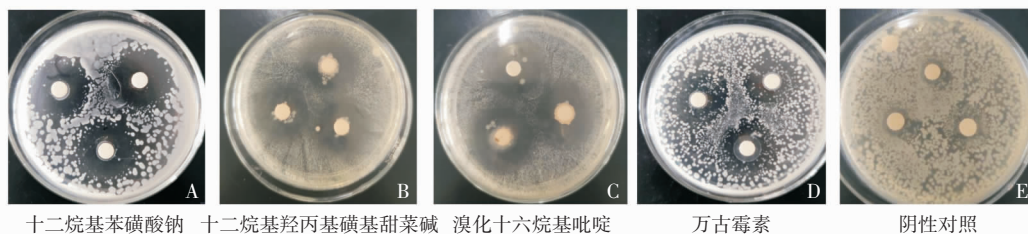
2.3 三种表面活性剂影响 Se 生物膜渗透性的测定

2.3.1 抑菌圈法 三种表面活性剂、万古霉素处理渗透模型后,红霉素经 6、12 h 的渗透,形成的抑菌圈直径(图以 1 MIC 处理组为例)及数据见图 2、表 3~4;可知随着渗透时间的增加,药物的渗透率都不断增加;同样条件下,表面活性剂对于生物膜渗透性的影响作用要强于阳性对照万古霉素。

红霉素渗透时间较短时(6 h),表面活性剂处理组与未处理组、阳性对照组相比,差异更加显著,不同浓度之间梯度差更加明显。见图 2、表 3~6。

2.3.2 高效液相色谱法 以高效液相色谱法测各组处理后牛津杯外红霉素渗透后浓度及渗透率,与抑菌圈法测得的渗透结果比较,趋势基本一致,见表 7~10。

红霉素渗透 6 h 后



红霉素渗透 12 h 后

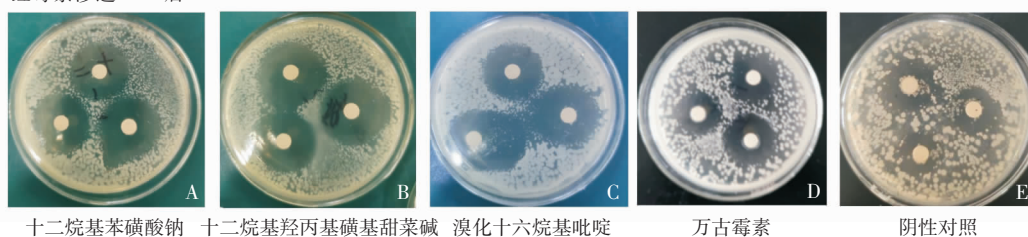


图 2 红霉素渗透 6、12 h 后的药敏纸片对 ATCC 12228 产生的抑菌圈图

Figure 2 Inhibition zones of ATCC 12228 produced by erythromycin discs after 6 and 12 hour permeation

表 3 红霉素渗透 6 h 后对 ATCC 12228 产生抑菌圈直径比较($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)

Table 3 Comparison of inhibition zone diameters of erythromycin on ATCC 12228 after 6 hour permeation ($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)

组别	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
十二烷基苯磺酸钠	2.360 7 ± 0.036 0***	2.015 0 ± 0.020 8***	1.781 3 ± 0.022 2***
十二烷基羧丙基磺基甜菜碱	2.293 0 ± 0.011 0***	1.961 7 ± 0.016 0***	1.712 7 ± 0.017 5***
溴化十六烷基吡啶	2.411 3 ± 0.013 9***	2.032 0 ± 0.029 1***	1.770 3 ± 0.036 5***
万古霉素	2.056 3 ± 0.019 6***	1.679 0 ± 0.022 6***	1.568 0 ± 0.017 1**
阴性对照		0.711 3 ± 0.021 5	
完全渗透		3.994 0 ± 0.007 5	

注:***表示与阴性对照组比较, $P < 0.001$; **表示与阴性对照组比较, $P < 0.01$ 。

表 4 红霉素渗透 12 h 后对 ATCC 12228 产生抑菌圈直径比较($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)

Table 4 Comparison of inhibition zone diameters of erythromycin on ATCC 12228 after 12 hour permeation ($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)

组别	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
十二烷基苯磺酸钠	3.206 0 ± 0.050 9***	2.706 0 ± 0.062 7***	2.351 3 ± 0.018 8***
十二烷基羧丙基磺基甜菜碱	3.160 7 ± 0.051 6***	2.609 3 ± 0.016 6***	2.295 3 ± 0.008 0***
溴化十六烷基吡啶	3.143 7 ± 0.057 8***	2.558 0 ± 0.017 3***	2.260 7 ± 0.019 3***
万古霉素	2.839 3 ± 0.033 5***	2.337 7 ± 0.031 0***	2.087 3 ± 0.022 0***
阴性对照		1.374 7 ± 0.050 9	
完全渗透		3.994 0 ± 0.007 5	

注:***表示与阴性对照组比较, $P < 0.001$ 。

表 5 红霉素渗透 6 h 后渗透率(%)

Table 5 Permeability rate of erythromycin after 6 hours permeation (%)

组别	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
十二烷基苯磺酸钠	59.11 ± 0.90	50.45 ± 0.52	44.60 ± 0.56
十二烷基羟丙基磺基甜菜碱	57.41 ± 0.28	49.12 ± 0.41	42.88 ± 0.44
溴化十六烷基吡啶	60.37 ± 0.34	50.88 ± 0.72	44.32 ± 0.91
万古霉素	51.48 ± 0.49	42.03 ± 0.57	39.26 ± 0.43
阴性对照		17.81 ± 0.54	

表 6 红霉素渗透 12 h 后渗透率(%)

Table 6 Permeability rate of erythromycin after 12 hour permeation (%)

组别	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
十二烷基苯磺酸钠	80.27 ± 1.27	67.75 ± 1.56	58.87 ± 0.47
十二烷基羟丙基磺基甜菜碱	79.14 ± 1.29	65.33 ± 0.42	57.47 ± 0.20
溴化十六烷基吡啶	78.71 ± 1.45	60.50 ± 0.43	56.60 ± 0.48
万古霉素	71.09 ± 0.84	58.53 ± 0.78	52.26 ± 0.56
阴性对照		34.42 ± 1.27	

表 7 高效液相色谱法测得不同处理组红霉素渗透 6 h 后的浓度(μg/mL)

Table 7 Concentrations of erythromycin in different treatment groups measured by high performance liquid chromatography after 6 hour permeation (μg/mL)

组别	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
十二烷基苯磺酸钠	7.283	6.472	6.175
十二烷基羟丙基磺基甜菜碱	7.349	6.792	5.858
溴化十六烷基吡啶	7.772	7.145	6.594
万古霉素	6.820	5.990	5.313
阴性对照		2.340	
完全渗透		13.636	

表 8 红霉素渗透 6 h 后渗透率(%)

Table 8 Permeability rate of erythromycin after 6 hour permeation (%)

组别	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
十二烷基苯磺酸钠	53.41	47.46	45.28
十二烷基羟丙基磺基甜菜碱	53.89	49.80	42.96
溴化十六烷基吡啶	57.00	52.40	48.35
万古霉素	50.01	42.93	38.96
阴性对照		17.16	

表 9 高效液相色谱法测得不同处理组红霉素渗透 12 h 后的浓度(μg/mL)

Table 9 Concentrations of erythromycin in different treatment groups measured by high performance liquid chromatography after 12 hour permeation (μg/mL)

处理组	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
十二烷基苯磺酸钠	10.260	9.180	7.700
十二烷基羟丙基磺基甜菜碱	10.710	8.796	8.213
溴化十六烷基吡啶	9.870	8.710	7.981
万古霉素	8.115	7.492	6.786
阴性对照		3.520	
完全渗透		13.64	

表 10 红霉素渗透 12 h 后渗透率(%)

Table 10 Permeability of erythromycin after 12 hour permeation (%)

组别	2 MIC	1 MIC	1/2 MIC
十二烷基苯磺酸钠	75.24	67.32	56.47
十二烷基羟丙基磺基甜菜碱	78.54	64.51	60.23
溴化十六烷基吡啶	72.38	63.87	58.53
万古霉素	59.51	54.94	49.77
阴性对照		25.81	

3 讨论

群体感应系统作为细菌产生的自诱导因子,去感知周围同类细菌的分布密度,进而调控基因表达的系统^[11]。1998 年 Davies 等^[12]发现,细菌的 QS 及特异基因表达调控在细菌生物膜形成过程中起到至关重要的作用。葡萄球菌具有独特和完善的 QS 系统,*agr* 是 Se QS 调控中的关键基因^[13]。目前 *agr* 在生物膜形成、分离中已经明确的作用,主要表现为:(1)下调生物膜初始黏附作用。由于 *agr* 基因能够下调与细菌初步黏附有关的一些黏附分子^[14-15],从而下调生物膜的形成。(2)上调菌细胞与生物膜之间的分离作用。*agr* 基因能上调酚溶解性调理素(Phenol soluble Modulins, PSMs)和蛋白酶的表达,故可促进后期菌细胞与生物膜的分离^[16]。研究^[17]表明,*agr* 的缺失可导致细菌毒力减弱。目前鉴于对 *agr* 的认识还比较有限,*agr* 所介导的 QS 系统在细菌生物膜感染过程中的作用仍存在争议。

本研究参考 Se 生物膜形成的一般规律设置不同作用时间段^[18],即 0~4 h 完成初始黏附,6 h 黏附的细菌开始相互聚集,12~18 h 细菌黏附达到高峰,24 h 生物膜基本成熟,30~48 h 部分生物膜开始崩解,进而观察三种表面活性剂对悬浮状态下产膜 Se 的 *agr* 转录水平的影响。结果发现,十二烷基羟丙基磺基甜菜碱在作用 0.5、4、12 h 时间段,对 *agr* 表达有显著上调作用($P < 0.001$)。十二烷基苯磺酸钠在作用 0.5、4、24 h 时间段,对 *agr* 表达有显著下调作用($P < 0.001$),在 12 h 时间段对 *agr* 表达有显著上调作用($P < 0.001$)。溴化十六烷基吡啶在作用 0.5 h 时间段对 *agr* 表达有显著上调作用($P < 0.01$),而在 12、24 h 时间段,则对 *agr* 表达有显著下调作用($P < 0.001$)。表明十二烷基羟丙基磺基甜菜碱、溴化十六烷基吡啶等部分表面活性剂能够在感染初期上调 *agr* 基因的表达,进而影响 Se 对生物材料的初始黏附作用,其中以十二烷基羟丙基磺基甜菜碱的作用尤为显著持久;而十二烷基苯磺酸钠则是在细菌黏附高峰期影响细菌的黏附。三种表面活性剂在作用 24 h 时对 *agr* 表达均有显著下调作用,推测可因此阻止生物膜内细菌与生物膜的分离,防止感染的扩散并导致细菌毒力的减弱。

本研究亦发现,三种类型表面活性剂在 2 MIC、1 MIC、1/2 MIC 浓度时,均明显影响生物膜的渗透性($P < 0.001$),增强药物对生物膜的渗透作用,且

影响渗透的作用效果优于目前临床对抗 Se 感染有效的药物万古霉素。

本研究表明,利用表面活性剂抑制和清除 Se 生物膜,从而控制由 Se 引起的慢性难治性感染具有良好广阔的应用前景。但表面活性剂虽然能有效影响 Se 生物膜,甚至作用要强于万古霉素,却仍然不能彻底解决 Se 生物膜引起的相关感染,仍需要探究新的治疗思路或以目前对表面活性剂的研究作为基础进行更深入探索。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(1): 73-111.
- [2] Harris LG, Dudley E, Rohde H, et al. Limitations in the use of PSM γ , *agr*, RNAIII, and biofilm formation as biomarkers to define invasive *Staphylococcus epidermidis* from chronic biomedical device-associated infections[J]. *Int J Med Microbiol*, 2017, 307(7): 382-387.
- [3] Reiter KC, Villa B, Paim TGDS, et al. Inhibition of biofilm maturation by linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: comparison with other drugs[J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 3): 394-399.
- [4] 蔡芝玲,莫梓童,郑诗倩,等.黄绵马酸 BB 联合红霉素抑制表皮葡萄球菌及其生物被膜的形成研究[J]. *中草药*, 2022, 53(8): 2417-2427.
Cai ZL, Mo ZT, Zheng SQ, et al. Antibacterial and antibiofilm effects of flavaspidic acid BB combined with erythromycin on *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53(8): 2417-2427.
- [5] 石晶金,李杰,许锦涛,等.十二烷基羟丙基磺基甜菜碱对表皮葡萄球菌生物被膜的影响[J]. *生物学杂志*, 2021, 38(2): 46-50, 83.
Shi JJ, Li J, Xu JT, et al. The effect of dodecyl hydroxypropyl sulfobetaine on biofilm of *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Journal of Biology*, 2021, 38(2): 46-50, 83.
- [6] 花私齐,段强军,官妍.表面活性剂溴化十六烷基吡啶对产膜表皮葡萄球菌黏附作用的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(3): 273-278.
Hua SQ, Duan QJ, Guan Y. Influence of cetylpyridinium bromide on the adhesion of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2018, 30(3): 273-278.
- [7] 官妍,吴嘉迪,李杰,等.十二烷基苯磺酸钠对引发内置物感染表皮葡萄球菌生物被膜的作用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 860-867.

- Guan Y, Wu JD, Li J, et al. Effect of sodium dodecyl benzene sulfonate on biofilm of *Staphylococcus epidermidis* with infection of the implant[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 860 - 867.
- [8] 官妍, 董仕政, 石晶金, 等. 十二烷基苯磺酸钠对产膜表皮葡萄球菌黏附作用影响初探[J]. 中国微生物生态学杂志, 2016, 28(2): 133 - 137.
- Guan Y, Dong SZ, Shi JJ, et al. A preliminary study on the influence of SDBS on *Staphylococcus epidermidis* adhesion in the process of producing biofilm[J]. Chinese Journal of Microecology, 2016, 28(2): 133 - 137.
- [9] 段强军, 花私齐, 官妍. 十二烷基羟丙基磺基甜菜碱对产膜表皮葡萄球菌粘附作用的影响[J]. 日用化学工业, 2017, 47(9): 497 - 501.
- Duan QJ, Hua SQ, Guan Y. Effect of dodecyl hydroxypropyl sulfobetaine on adhesion of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation bacteria [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2017, 47(9): 497 - 501.
- [10] 官妍, 陈冉, 汪长中, 等. 苦参碱/鱼腥草素钠及其与红霉素联用对表皮葡萄球菌生物被膜渗透作用的研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 2016, 28(5): 515 - 519.
- Guan Y, Chen R, Wang CZ, et al. Permeabilities of matrine and sodium houttuynfonate alone and in combination with erythromycin through *Staphylococcus epidermidis* biofilm[J]. Chinese Journal of Microecology, 2016, 28(5): 515 - 519.
- [11] 刘琳, 谭小娟, 贾爱群. 细菌群体感应与细菌生物被膜形成之间的关系[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 271 - 278.
- Liu L, Tan XJ, Jia AQ. Relationship between bacterial quorum sensing and biofilm formation-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(3): 271 - 278.
- [12] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm [J]. Science, 1998, 280(5361): 295 - 298.
- [13] Li JR, Wang WL, Xu SX, et al. Lactobacillus reuteri-produced cyclic dipeptides quench *agr*-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(8): 3360 - 3365.
- [14] Dai L, Yang L, Parsons C, et al. *Staphylococcus epidermidis* recovered from indwelling catheters exhibit enhanced biofilm dispersal and “self-renewal” through downregulation of *agr* [J]. BMC Microbiol, 2012, 12: 102.
- [15] Schaeffer CR, Woods KM, Longo GM, et al. Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model[J]. Infect Immun, 2015, 83(1): 214 - 226.
- [16] Loughran AJ, Atwood DN, Anthony AC, et al. Impact of individual extracellular proteases on *Staphylococcus aureus* biofilm formation in diverse clinical isolates and their isogenic *sarA* mutants[J]. Microbiologyopen, 2014, 3(6): 897 - 909.
- [17] 袁吉振, 杨杰, 袁文常, 等. 金黄色葡萄球菌 *agr* 基因敲除及其对膜泡毒力影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(4): 331 - 335.
- Yuan JZ, Yang J, Yuan WC, et al. Gene knockout of *Staphylococcus aureus agr* and its effect on virulence of bacterial membrane vesicles[J]. Journal of Third Military Medical University, 2014, 36(4): 331 - 335.
- [18] 叶联华, 黄云超, 杨达宽, 等. 聚氯乙烯材料表面细菌生物膜结构观察[J]. 生物医学工程与临床, 2007, 11(4): 251 - 254, 封3.
- Ye LH, Huang YC, Yang DK, et al. Study on the structure of bacterial biofilm on PVC surface[J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2007, 11(4): 251 - 254.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:石晶金, 方溢文, 官妍. 三种表面活性剂对表皮葡萄球菌生物膜渗透性及成膜关键基因 *agr* 表达的影响[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(3): 267 - 274. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20233382.

Cite this article as: SHI Jing-jin, FANG Yi-wen, GUAN Yan. Effect of three surfactants on the permeability of *Staphylococcus epidermidis* biofilm and the expression of key biofilm-forming gene *agr*[J]. Chin J Infect Control, 2023, 22(3): 267 - 274. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20233382.