

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20233135

· 综述 ·

金黄色葡萄球菌生物被膜耐药机制研究进展

曾建业, 陈丹丹, 王侯祺, 吕纯莉, 王小敏

(遵义医科大学基础医学院微生物学教研室, 贵州 遵义 563000)

[摘要] 金黄色葡萄球菌是常见的引起医院感染和社区感染的致病菌之一。近年来, 临床上金黄色葡萄球菌抗感染治疗失败的病例越来越多, 生物被膜的形成被认为是导致抗菌药物治疗失败的主要原因。然而, 金黄色葡萄球菌生物被膜的耐药机制并未完全阐明。证据表明, 金黄色葡萄球菌生物被膜感染难以治愈且容易反复, 感染后反复治疗将大大增加患者的痛苦和经济负担。本文对金黄色葡萄球菌生物被膜耐药机制的研究进展进行综述, 以期为开发新的抗菌药物提供参考依据。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 生物被膜; 耐药机制; 生物被膜感染

[中图分类号] R378 R446.5

Research progress on the mechanism of drug resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm

ZENG Jian-ye, CHEN Dan-dan, WANG Yu-qi, LYU Chun-li, WANG Xiao-min (Department of Microbiology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

[Abstract] *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is one of the common pathogens causing healthcare-associated infection (HAI) and community-associated infection (CAI). In recent years, there are more and more failure cases in the anti-infection treatment of *S. aureus* in clinical practice, and the formation of biofilm is considered the main cause for the failure of antimicrobial treatment. However, drug resistance mechanism of *S. aureus* biofilm has not been fully elucidated. Evidence shows that *S. aureus* biofilm infection is difficult to cure and easy to reoccur, and repeated treatment after infection greatly increases the pain and economic burden of patients. In this paper, research progress of drug resistance mechanism of *S. aureus* biofilm is reviewed, so as to provide reference for the development of new antimicrobial agents.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; biofilm; drug resistance mechanism; biofilm infection

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是引起医院感染和社区获得性感染常见病原体之一, 主要引起皮肤软组织感染、心内膜炎、骨髓炎、菌血症和致死性肺炎等多种疾病^[1-2]。SA 通常可以无症状定植于 30%~50% 人群的前鼻孔, 且 SA 鼻腔携带者的感染风险是非携带者的 2~12 倍^[3]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)等耐药菌株在全球范围内出现, 是导致患者病死率增加的主要原因, 同时加重了

社会经济负担^[4-5]。由于 SA 对大多数常用抗菌药物耐药, 给医疗机构带来了巨大负担, 因此, 世界卫生组织将 SA 列为优先级 II 类病原体^[6]。人体大约 80% 的慢性和复发性感染由细菌生物被膜引起^[3], SA 是生物被膜感染常见的病原体之一^[7]。文献^[8]报道, 43%~88% 的 SA 临床分离株可以形成生物被膜。细菌生物被膜具有很强抗药性, 能够帮助细菌逃避抗菌药物的杀伤, 也是 SA 产生耐药性的重要原因^[9]。研究^[10]表明, 86.7% 产生生物被膜的 SA

[收稿日期] 2022-07-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(32260883); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2018]5772-005)

[作者简介] 曾建业(1996-), 男(汉族), 湖南省衡阳市人, 硕士研究生, 主要从事病原微生物感染与疾病研究。

[通信作者] 王小敏 E-mail: wxm_zmu@163.com

具有多重耐药性。因此,SA 生物被膜相关感染是全球公共卫生领域的主要关注点之一。生物被膜导致治疗困难是当前面临的难题,其耐药机制还有待进一步阐明。目前,尚无有效的针对生物被膜的治疗方法^[11]。本文就 SA 生物被膜耐药机制研究的最新进展作一综述,旨在为开发针对 SA 生物被膜新的治疗方法提供思路,为生物被膜耐药相关研究提供参考依据。

1 SA 生物被膜概述

细菌生物被膜是附着在生物和非生物表面的微生物种群组成的细胞外结构,表面包裹有细菌分泌的聚合物如胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)、细胞外 DNA(extracellular DNA, eDNA)、蛋白质等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分^[12]。影响 SA 生物被膜耐药性的相关因素较多,包括生物被膜基质成分与抗菌药物的相互作用,生物被膜的异质性,持久细胞(persister cells)的出现,外排泵(efflux pump, EP)的表达增加,抗菌药物抗性基因的种间转移等。

2 SA 生物被膜耐药性产生机制

2.1 eDNA 增强细菌耐药性 eDNA 是 SA 生物被膜基质的主要成分,不仅可以增加生物被膜结构的稳定性,还可以增加对带正电荷抗菌药物(电荷的正负受微环境 pH 影响)的耐药性^[13-14]。SA 在生物被膜成熟期间发生裂解并释放基因组 DNA,是 eDNA 形成的主要原因,但具体形成机制未完全阐明^[13-15]。SA 一般通过自溶素 A 介导的自溶(裂解的一种方式)释放 eDNA,但低抑制剂量的抗菌药物通过杀死一小部分细菌也可以刺激 eDNA 的释放^[16]。eDNA 作为阴离子可螯合和中和阳离子杀菌分子,包括氨基糖苷类、青霉素 G 等抗菌药物和防御素、乳铁蛋白等抗菌肽,并限制阳离子抗菌剂的扩散^[17]。带负电荷的 eDNA 可以通过降低电化学梯度降低对氨基糖苷类药物、四环素类药物和大环内酯类药物的敏感性^[18]。如万古霉素和 eDNA 的结合常数比万古霉素和其靶标肽聚糖前体中 D-Ala-D-Ala 肽的结合常数高 100 倍,导致万古霉素消耗在生物被膜 ECM 中^[18]。此外,eDNA 能够酸化局部环境,促进抗菌药物耐药表型的产生^[19]。eDNA 还参与基因水平转移(horizontal gene transfer, HGT),即基

因组之间遗传信息的非接合性转移^[15]。因此,eDNA 可以作为有价值的抗生物被膜靶标。

2.2 持久细胞对抗菌药物的耐受作用 持久细胞与 SA 生物被膜的抗菌药物耐受性有关,是生物被膜相关复发性感染的主要原因^[20]。持久细胞是一种短暂耐抗菌药物的细菌细胞,通常生长缓慢或生长受阻^[21]。在生物被膜相关感染中,抗菌药物可以清除生物被膜内的大部分细菌,包括从生物被膜中脱离的细菌,其余的可以被免疫系统清除,但是留在内部或基部的持久细胞很难被抗菌药物清除^[22]。SA 持久细胞内电子传递链的缺陷导致色素沉着,细胞壁合成、生长、呼吸等过程的减少和外毒素的产生,进而降低通过靶向这些细胞过程发挥杀菌活性的抗菌药物(如 β -内酰胺类药物)的功效,使持久细胞对抗菌药物具有耐受性^[23]。SA 生物被膜内的高细胞密度环境,氧气、营养的缺乏和细胞内 ATP 浓度降低,SOS 反应的启动和毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统基因的表达等均能促进持久细胞的产生^[24]。TA 系统是持久细胞产生的主要因素,而 ATP 浓度下降似乎是 SA 持久细胞在抗菌药物作用下存活的主要因素^[20]。长期抗菌治疗促进持久细胞产生,导致慢性感染反复出现^[22]。抗菌治疗对持久细胞的“致命弱点”,是重新激活与生物被膜相关的慢性感染的关键因素,一旦撤销抗菌药物,充当疾病储存库的持久细胞就可以重新激活、分裂繁殖并出现感染^[22,25]。因此,清除持久细胞可能是消灭生物被膜相关慢性和复发性感染的关键步骤。

2.3 HGT 介导细菌产生耐药性 HGT 允许抗性基因转移到其他种类的细菌内,是已知的新抗性基因传播的主要机制,促进细菌耐药性的快速传播^[26]。耐药基因的水平转移是生物被膜内的细菌对抗菌药物耐药的重要作用机制之一。生物被膜内稳定的物理环境、高细胞密度、增强的遗传能力和积累的可移动遗传元件,为有效的 HGT(包括对耐药基因的摄取)提供了理想的环境^[27]。细菌可以通过接合、转导和自然转化来获取和整合新的基因^[28]。大多数 SA 可被噬菌体溶源化,噬菌体转导是 SA 中常见的 HGT 机制^[29]。整合子是由整合酶基因、特异性重组位点和启动子组成的遗传元件。通过整合子调节抗生素抗性基因是生物被膜通过 HGT 增强获得抗微生物抗性的决定因素^[30]。研究^[25]表明,SA 生物被膜可通过接合或非接合性质粒的传递导致质粒携带的抗生素抗性基因传播。SA 在生物被膜状态下的多药抗性质粒的接合转移频率比浮游状态高 10 000

倍,这可能是由于生物被膜内的细菌位置相对固定和邻近^[31]。生物被膜中细胞与细胞的紧密接触为 HGT 创造了有利条件,生物被膜的形成增加 SA 通过 HGT 获得和传播携带耐药基因质粒的能力^[32]。因此,为预防和控制生物被膜内 SA 通过抗性基因的水平转移增强耐药性,需要探索新的治疗靶点或组合疗法。

2.4 群体感应(quorum sensing, QS)增强细菌耐药性 QS 是细菌细胞间信号传导的过程,依赖于被称为自诱导剂的细胞外信号分子的产生、检测和响应^[33]。细菌 QS 信号主要由酰基高丝氨酸内酯(acyl-homoserine lactone, AHL)、自体诱导肽(autoinducing peptide, AIP)和自体诱导物 II 类分子(autoinducer-2, AI-2)组成,参与细菌的各种生理过程,包括生物被膜形成,质粒接合、运动和抗菌药物抵抗^[34]。一方面, QS 系统能够调节生物被膜形成基因,也能调节细菌耐药相关基因^[35]。细菌可以通过 QS 系统调节,从单个细胞转变为多个细胞协同的方式生存,进而转变为生物被膜生长模式以抵抗或逃避抗菌药物的杀伤^[36]。另一方面, QS 系统可以调节 EP 基因的表达,而 EP 可以有效地将抗菌药物从细菌体内排出,从而在耐药过程发挥重要作用^[35]。辅助基因调控(auxiliary gene regulation, Agr)QS 系统是 SA 致病性的中心调节器,在细菌成熟、生物被膜的扩散中起关键作用,并有助于形成新的定植位点^[37]。研究^[30]表明,抑制 SA 生物被膜中 RNAIII 激活肽的靶标(target of RNAIII-activating peptide, TraP)QS 受体,可减少细菌细胞壁肽聚糖合成和基质中 eDNA 含量,显著提高头孢菌素、万古霉素、达托霉素、利奈唑胺、妥布霉素和夫西地酸对 SA 的抗菌效果。

2.5 EP 导致细菌对抗菌药物产生耐药性 EP 在各种细菌中广泛存在。细菌 EP 是一种存在于细胞膜上,从细胞膜内外质子或离子(如钠)形成的化学梯度中获取能量的二级主动转运蛋白,可将大部分临床相关的抗菌药物从细菌内部排到细胞外,是细菌对抗菌药物产生耐药性的关键机制^[38]。EP 在生物被膜发育中也发挥了重要作用:(1)辅助 QS 分子和群体淬灭(quorum quenching, QQ)分子外流促进生物被膜基质的形成;(2)间接调节生物被膜形成相关基因的表达^[39]。在包含 SA 的革兰阳性菌中,主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)在五个主要的 EP 家族中发挥重要作用^[40]。SA MFS 中的 NorA EP 作为 SA 最有效

的耐多药系统,可排出氟喹诺酮类抗菌药物和季铵化合物, MepA EP 也可排出氟喹诺酮类等不同类别的抗菌药物^[40-42]。在生物被膜生长过程中, SA 中 EP 基因 *mdeA*、*norB* 和 *norC* 的相对表达水平上调,其中 *norB* 和 *norC* EP 可以排出胞内的西曲米和喹诺酮类等抗菌药物,而 MdeA EP 可排出胞内的季铵化合物(表面消毒剂)和抗菌药物^[43]。

3 结语

SA 生物被膜对多种抗菌药物耐药,感染后患者发病率和病死率显著增加,给临床抗感染治疗带来严峻挑战。本综述旨在分析 SA 生物被膜在抗菌药物耐药性增加过程中的作用并介绍相关机制。尽管目前已经对铜绿假单胞菌(研究最多的生物被膜模式菌)生物被膜进行了大量研究,但是对 SA 等其他细菌生物被膜的研究相对较少。不同细菌生物被膜在耐药性产生方面存在很大差异, SA 作为细菌生物被膜感染中最常见的病原体之一,目前尚未探索出针对其生物被膜相关感染的有效治疗策略。因此,需对 SA 生物被膜的耐药机制进行更多研究。SA 生物被膜耐药机制及具体过程仍不清楚,分析 SA 生物被膜耐药的具体机制,有助于制定与其感染相关的新治疗方案和策略。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Xiang H, Cao FJ, Ming D, et al. Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(17): 6671 - 6681.
- [2] Dadashi M, Hajikhani B, Darban-Sarokhalil D, et al. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: a systematic review and Meta-analysis [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 20: 238 - 247.
- [3] da Silva AC, Rodrigues MX, Silva NCC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review [J]. Braz J Microbiol, 2020, 51(1): 347 - 356.
- [4] Snell SB, Gill AL, Haidaris CG, et al. *Staphylococcus aureus* tolerance and genomic response to photodynamic inactivation [J]. mSphere, 2021, 6(1): e00762 - 20.
- [5] Idrees M, Sawant S, Karodia N, et al. *Staphylococcus aureus* biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies [J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(14): 7602.

- [6] Zou YL, Fang W. Naturally derived glycosides with potential activity against *Staphylococcus aureus* [J]. *Curr Top Med Chem*, 2021, 21(27): 2500–2512.
- [7] Hortaç İstar E, Alışkan HE, Başustaoglu A. Determination of biofilm formation properties of methicillin sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* isolates by conventional and molecular methods[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2020, 54(2): 223–234.
- [8] Luther MK, Parente DM, Caffrey AR, et al. Clinical and genetic risk factors for biofilm-forming *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(5): e02252–17.
- [9] Guo YL, Song GH, Sun ML, et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 107.
- [10] Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, et al. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance[J]. *Int J Gen Med*, 2018, 11: 25–32.
- [11] Alavi SE, Koohi Moftakhari Esfahani M, Raza A, et al. PEG-grafted liposomes for enhanced antibacterial and antibiotic activities: an in vivo study[J]. *NanoImpact*, 2022, 25: 100384.
- [12] 涂春田, 汪洋, 易力, 等. 信号分子调控细菌生物被膜形成的分子机制[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(4): 558–566.
- Tu CT, Wang Y, Yi L, et al. Role of signaling molecules in biofilm formation [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(4): 558–566.
- [13] Rossi CC, Pereira MF, Giambiagi-deMarval M. Underrated *Staphylococcus* species and their role in antimicrobial resistance spreading[J]. *Genet Mol Biol*, 2020, 43(1 suppl 2): e20190065.
- [14] Dakheel KH, Abdul Rahim R, Neela VK, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms and their influence on bacterial adhesion and cohesion[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 4708425.
- [15] Panlilio H, Rice CV. The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(6): 2129–2141.
- [16] Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. Tracing the origins of extracellular DNA in bacterial biofilms: story of death and predation to community benefit[J]. *Biofouling*, 2021, 37(9–10): 1022–1039.
- [17] Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2015, 41(3): 341–352.
- [18] Uruén C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, et al. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 10(1): 3.
- [19] Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. Extracellular DNA (eDNA). A major ubiquitous element of the bacterial biofilm architecture[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 9100.
- [20] Karimaei S, Kazem Aghamir SM, Foroushani AR, et al. Antibiotic tolerance in biofilm persister cells of *Staphylococcus aureus* and expression of toxin-antitoxin system genes[J]. *Microb Pathog*, 2021, 159: 105126.
- [21] Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(8): 453–464.
- [22] Paraje MG. Persist and triumph: persistent cells in microbial biofilm[J]. *Rev Argent Microbiol*, 2018, 50(3): 231–233.
- [23] Chang J, Lee RE, Lee W. A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: a role of persister cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43(6): 630–638.
- [24] Sahukhal GS, Pandey S, Elasri MO. msaABC operon is involved in persister cell formation in *Staphylococcus aureus*[J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 218.
- [25] Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(4): 493–512.
- [26] Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2018, 42(1): fux053.
- [27] Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(9): 563–575.
- [28] Nolan LM, Turnbull L, Katrib M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* is capable of natural transformation in biofilms[J]. *Microbiology (Reading)*, 2020, 166(10): 995–1003.
- [29] Cafini F, Thi Le Thuy N, Román F, et al. Methodology for the study of horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* [J]. *J Vis Exp*, 2017(121): 55087.
- [30] Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41(3): 276–301.
- [31] Luo Y, Yang QQ, Zhang D, et al. Mechanisms and control strategies of antibiotic resistance in pathological biofilms[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(1): 1–7.
- [32] Sadiq FA, Flint S, Li YJ, et al. Phenotypic and genetic heterogeneity within biofilms with particular emphasis on persistence and antimicrobial tolerance[J]. *Future Microbiol*, 2017, 12: 1087–1107.
- [33] Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(6): 371–382.
- [34] Jiang Q, Chen JS, Yang CB, et al. Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2015978.
- [35] Zhao XH, Yu ZX, Ding T. Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 425.
- [36] Jorge P, Magalhães AP, Grainha T, et al. Antimicrobial resistance three ways: healthcare crisis, major concepts and the relevance of biofilms[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2019, 95(8): fiz115.

- [37] Dotto C, Lombarte Serrat A, Ledesma M, et al. Salicylic acid stabilizes *Staphylococcus aureus* biofilm by impairing the agr quorum-sensing system[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 2953.
- [38] Tang MR, Wei X, Wan X, et al. The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microb Pathog, 2020, 147: 104244.
- [39] AlMatar M, Albarri O, Makky EA, et al. Efflux pump inhibitors: new updates[J]. Pharmacol Rep, 2021, 73(1): 1–16.
- [40] Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: from bench to bedside[J]. Indian J Med Res, 2019, 149(2): 129–145.
- [41] Monteiro KLC, de Aquino TM, Mendonça Junior FJB. An update on *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors [J]. Curr Top Med Chem, 2020, 20(24): 2168–2185.
- [42] Faraag AHI, Shafaa MW, Elkholy NS, et al. Stress impact of liposomes loaded with ciprofloxacin on the expression level of MepA and NorB efflux pumps of methicillin-resistant *Staphy-*

lococcus aureus[J]. Int Microbiol, 2022, 25(3): 427–446.

- [43] Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(8): 2003–2020.

(本文编辑:孟秀娟、翟若南)

本文引用格式:曾建业,陈丹丹,王侯棋,等.金黄色葡萄球菌生物被膜耐药机制研究进展[J].中国感染控制杂志,2023,22(2):244–248. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20233135.

Cite this article as: ZENG Jian-ye, CHEN Dan-dan, WANG Yu-qi, et al. Research progress on the mechanism of drug resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm[J]. Chin J Infect Control, 2023, 22(2): 244–248. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233135.