

曲霉生物膜的形成过程与结构特征

李丽娟 陈伟 许辉 万喆 李若瑜 刘伟

(北京大学第一医院皮肤性病科真菌室 北京大学真菌和真菌病研究中心, 北京 100034)

【摘要】 目的 研究曲霉生物膜的形成过程和结构特征。方法 我们利用一个曲霉生物膜体外模型研究其形成过程和结构特征。将 200 μ L 浓度为 1×10^5 孢子/mL 的受试曲霉 (烟曲霉 AF293, 黄曲霉 BMU0394Q, 土曲霉 BMU00802, 黑曲霉 BMU04689) 的孢子悬液加到 24 孔组织培养板中的无菌塑料细胞培养盖玻片上, 37 $^{\circ}$ C 孵育不同时间 (0, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 18, 24, 48, 72 h), 加入 25 μ mol/L 的 FUN-1 室温避光染色后, 用波长 488 nm 激光激发, 通过共聚焦激光扫描显微镜观察曲霉生物膜的形成过程; 再用波长为 488 nm 和 633 nm 激光同时激发, 将两个波长下的图像叠加后观察曲霉生物膜的活力; 利用 XYZ 轴成像观察其结构特征。在上述不同的时间点用钙荧光白染色后, 用波长为 405 nm 的紫外光激发, 观察曲霉生物膜细胞外基质的产生。结果 烟曲霉 AF293 在第 4 h 即开始有散在的孢子黏附于盖玻片上; 8 h 时孢子开始萌芽, 10~12 h 菌丝延长形成单细胞层; 16~20 h 菌丝缠绕形成多层立体结构; 24 h 形成一个具有复杂的三维立体结构特征的多细胞菌落, 菌丝有序排列, 细胞外基质弥散的分布在菌丝的周围; 48~72 h 生物膜逐渐成熟。成熟的烟曲霉生物膜是由细胞外基质包裹的有序排列的菌丝形成的复杂立体结构。黄曲霉 BMU0394Q, 土曲霉 BMU00802, 黑曲霉 BMU04689 与烟曲霉 AF293 有类似的生物膜发育阶段, 包括黏附、孢子萌芽、菌丝延长、菌丝有序排列形成三维立体结构。结论 烟曲霉、黄曲霉、土曲霉和黑曲霉在体外都能形成典型的生物膜, 它的形成过程和结构特征与其他真菌生物膜类似。

【关键词】 曲霉; 生物膜; 结构特征

【中图分类号】 R 379.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)02-0093-05

Development and architecture characteristics of *Aspergillus* biofilm

LI Lijuan, CHEN Wei, XU Hui, WAN Zhe, LIRuo-yu, LIU Wei

(Department of Dermatovenereology, Peking University First Hospital and Research Center for Medical Mycology, Peking University, Beijing 100034 China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the development and architecture characteristics of *Aspergillus* biofilm. **Methods** *In vitro* biofilms of *Aspergillus fumigatus* (AF293), *Aspergillus flavus* (BMU0394Q), *Aspergillus terreus* (BMU00802) and *Aspergillus niger* (BMU04689) formed on the surface of sterile plastic cell culture coverslips in 24-well tissue culture plates by adding 200 μ L of 1×10^5 spores/mL cell suspension to each well. After incubation at 37 $^{\circ}$ C for various time periods (2, 4, 8, 10, 12, 16, 18, 24, 48 and 72 h), the biofilms were stained with FUN-1 in dark for 45 minutes. The forming process and vitality were examined under confocal microscope by 488 or combination with 633 argon ion laser stimulation. Calcofluor white stain was applied to observe cytoplasm production with 405 argon ion laser triggering. **Results** *A. fumigatus* conidial adhesion occurred at 4 h and conidia began to swell and germinate at 8 h. Hyphae intertwined and a monolayer formed at 10 to 12 h, followed by network structure forming at 16 to 20 h. Then the complex three-dimensional architecture with extracellular matrix around hyphae was set up at 24 h, with gradual maturation at 48 to 72 h. Similar to *A. fumigatus*, the biofilms of *A. flavus*, *A. terreus* and *A. niger* had distinct developmental phases including adhesion, germination, filamentation, monolayer development, proliferation and maturation. **Conclusions** *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* and *A. niger* are able to form typical biofilm with distinct developmental phases and architecture characteristics.

【Key words】 *Aspergillus* spp.; biofilm; architecture characteristic

[Chin J Mycol 2011, 6(2): 93-97]

基金项目: 国家自然科学基金 (30970131), 北京市自然科学基金 (7102149)。

作者简介: 李丽娟, 女 (汉族), 硕士研究生在读。E-mail: lilj630@sina.com

通讯作者: 刘伟, E-mail: liw90@yahoo.com

生物膜是由细胞外多聚基质包裹的菌丝相互黏附构成的有结构的微生物群落,是相对于游离状态菌细胞而言的微生物的另一种存在方式^[1]。80%以上的细菌在自然环境中以生物膜的形式存在^[2]。而且,细菌、念珠菌等还可以在人类宿主体内形成生物膜^[2]。如念珠菌可以定植到血管内导管或其他内置器械的表面并形成生物膜,其上的菌细胞脱落时,可以导致急性真菌血症或播散感染^[3-5]。念珠菌形成的生物膜能对抗宿主的防御,并且对临床常用抗真菌药物的敏感性降低^[6],从而导致生物膜相关的感染很难得到有效的治疗和控制。

近年来,曲霉引起的感染数量逐年增加,它已经成为免疫受损患者发病和死亡的一个重要原因^[7,8]。曲霉球是正在逐渐增多的一种曲霉病,多见于肺结核空洞和上颌窦^[9,10];组织病理学研究显示,曲霉球是由有序排列的菌丝构成,菌丝周围有细胞外基质包裹,无宿主细胞浸润^[10],这种结构与人们观察到的生物膜的结构非常相似^[1,11,12]。因此,本试验旨在研究曲霉是否可以形成生物膜,并观察其形成过程和结构特征。

1 材料与方法

1.1 受试菌株

4株受试曲霉均为临床分离株,菌株在北京大学真菌和真菌病研究中心保存。烟曲霉 AF293 黄曲霉 BMU0394Q 土曲霉 BMU00802 黑曲霉 BMU04689。

1.2 试剂和仪器

钙荧光白 (Sigma Chemical co, St Louis), FUN-1 (Invitrogen), RPM F-1640 (Invitrogen), 共聚焦激光扫描显微镜 (OLYMPUS-FV1000)。

1.3 共聚焦激光扫描显微镜观察曲霉生物膜的形成过程和结构特征

所有受试曲霉在沙氏培养基上 35℃培养 3 d 后,用 5 mL 含 0.025% Tween 20 的 PBS 冲洗平皿表面收集孢子,用 20 mL RPM F-1640 重悬孢子,用血细胞板计数,使其终浓度为 1×10^5 孢子/mL。

曲霉生物膜特征的观察 我们使用一个体外模型评估生物膜的形成过程和结构特征。将 200 μ L 浓度为 1×10^5 孢子/mL 的受试曲霉的孢子悬液加入到 24 孔组织培养板中的无菌塑料细胞培养盖玻片 (直径 13 mm) 上^[13], 37℃ 孵育不同时间 (0

2, 4, 8, 10, 12, 16, 18, 24, 48, 72 h), 用无菌的 PBS 冲洗盖玻片, 加入 25 μ mol/L 的 FUN-1, 室温避光染色 45 min, 然后再用 PBS 冲洗盖玻片, 将其放置在载玻片上。用共聚焦激光扫描显微镜 (OLYMPUS-FV1000, 200 \times) 波长 488 nm 激光激发, 孢子或菌丝为绿色荧光。用共聚焦激光扫描显微镜 (OLYMPUS-FV1000, 200 \times) 波长为 488 nm 和 633 nm 激光同时激发, 两个波长下的图像叠加以后, 代谢活性好的菌丝会发桔黄色的荧光, 静止的和死亡的菌丝发绿色荧光。利用 XYZ 轴成像观察其结构特征和活力。

曲霉生物膜中菌丝外的细胞外基质的观察在上述不同的时间点同时用钙荧光白染色, 用共聚焦激光扫描显微镜 (OLYMPUS-FV1000, 200 \times) 波长为 405 nm 的紫外光激发。

2 结果

2.1 曲霉生物膜特征的观察

我们利用一个已有的曲霉生物膜体外模型^[13] 观察烟曲霉 AF293 黄曲霉 BMU0394Q 土曲霉 BMU00802 和黑曲霉 BMU04689 生物膜的形成过程。AF293 生物膜的形成过程见图 1。AF293 在第 4 h 即开始有散在的孢子黏附于盖玻片上; 8 h 时孢子开始萌芽; 10~12 h 菌丝延长形成单细胞层; 16~20 h 菌丝缠绕形成多层立体结构; 24 h 时形成菌丝有序排列、具有复杂的三维立体结构特征的多细胞菌落; 48~72 h 生物膜逐渐成熟。将 24 h 时烟曲霉 AF293 生物膜在 488 nm 和 633 nm 两个波长下的图像叠加以后, 生物膜中的菌丝发桔黄色的荧光, 说明生物膜中菌丝的活力很好 (见图 2)。

黄曲霉 BMU0394Q 土曲霉 BMU00802 和黑曲霉 BMU04689 的生物膜形成过程和 AF293 的类似 (图片未显示), 包括黏附 (4 h)、孢子萌芽 (8 h)、菌丝延长形成长单细胞层 (10~12 h)、菌丝缠绕形成多层立体结构 (16~20 h)、24 h 时形成具有复杂的三维立体结构特征的多细胞菌落、48~72 h 生物膜逐渐成熟。24 h 时生物膜中菌丝的活力很好。

2.2 曲霉生物膜中菌丝外的细胞外基质的观察

我们利用钙荧光白染色技术证明了细胞外基质的存在。研究发现在烟曲霉 AF293 形成生物膜的过程中, 16~18 h 时可见细胞外基质弥散的分布在菌丝周围, 而且随着时间的延长细胞外基质的量也随之增多 (24h) (见图 3)。

黄曲霉 BMU 0394Q 土曲霉 BMU00802和黑曲霉 BMU 04689形成生物膜的过程中, 16~ 18 h时可见细胞外基质弥散的分布在菌丝周围, 而且随着时间的延长细胞外基质的量也随之增多 (24 h) (图片未显示)。

2.3 曲霉生物膜的立体结构特征

我们将一系列 Z轴扫描的 XY 方向的图片经

过编辑, 利用软件三维重建 24 h的 AF293生物膜的立体结构, 观察其结构特征。结果显示, 成熟的烟曲霉生物膜是由细胞外基质包裹的有序排列的菌丝形成的复杂立体结构 (见图 4a)。将 488 nm 和 633 nm 两个波长下的图像叠加以后, 生物膜中的菌丝发桔黄色的荧光, 说明生物膜中菌丝的活力很好 (见图 4b)。

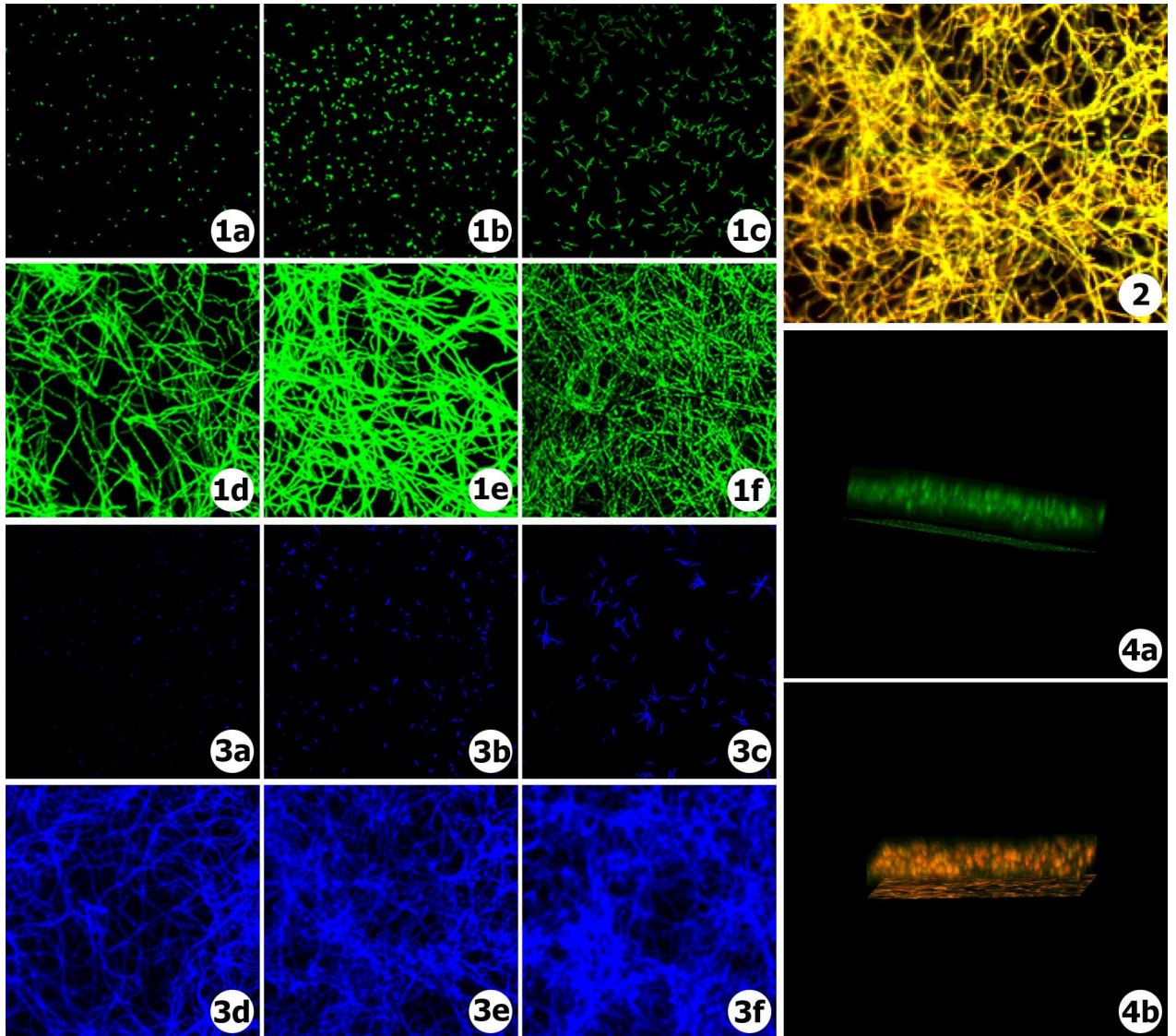


图 1 FUN-1染色观察烟曲霉 AF293生物膜形成过程 [FUN-1染色后, 共聚焦激光扫描显微镜在 200×的放大倍数下用 488 nm 氩离子激光激发照相: a 孢子黏附 (4 h), b 孢子萌芽 (8 h), c 菌丝延长 (10 h), d~ e 菌丝形成相互交错的网状结构 (16~ 18 h), f 菌丝有序排列的三维立体结构 (24 h)] 图 2 FUN-1染色观察烟曲霉 AF293生物膜 24 h时的活力: FUN-1染色后, 共聚焦激光扫描显微镜在 200×的放大倍数下用 488 nm 和 633 nm 氩离子激光同时激发照相, 可见 24 h时烟曲霉 AF293生物膜中菌丝的活力很好 图 3 钙荧光白染色观察烟曲霉 AF293生物膜菌丝外的细胞外基质 (钙荧光白染色后, 共聚焦激光扫描显微镜在 200×的放大倍数下用 405 nm 的紫外光激发照相: a~ f 分别是 4 h, 8 h, 10 h, 16 h, 18 h, 24 h 生物膜的钙荧光白染色图。16 h 菌丝形成相互交错的网状结构时有细胞外基质的产生, 而且随着时间的延长细胞外基质的量逐渐增加) 图 4 FUN-1染色观察 AF293生物膜 (24 h) 的结构特征和活力: a 烟曲霉生物膜是由细胞外基质包裹的菌丝有序排列形成的多细胞菌丝体结构, b 24 h 时烟曲霉 AF293生物膜中菌丝的活力很好

Fig 1 Development of *Aspergillus fumigatus* 293 biofilm with FUN-1 stain [biofilms examined under confocal microscope with 488 argon ion laser stimulation ($\times 200$): a Conidial adhesion (4 h), b Conidia gemination (8 h), c Hyphal elongation (10 h), d-e Hyphae intertwined network structure (16-18 h), f Three-dimensional structure of an orderly hyphae (24 h) **Fig 2** Viability of *Aspergillus fumigatus* 293 biofilm (24 h) with FUN-1 stain good viability of *Aspergillus fumigatus* 293 biofilm under confocal microscope with 488 and 633 argon ion laser stimulation ($\times 200$) **Fig 3** Extracellular matrix production by *Aspergillus fumigatus* 293 biofilm with Cakofluor white staining [Biofilms under confocal scanning microscope with 405 argon ion laser stimulation ($\times 200$): a-f 4 h, 8 h, 10 h, 16 h, 18 h and 24 h respectively. Extracellular matrix produced at 16 h and increased afterwards] **Fig 4** The architecture characteristics and viability of *Aspergillus fumigatus* 293 biofilm (24 h) with FUN-1 staining a *Aspergillus fumigatus* biofilm composed of microbial communities within extracellular matrix, b Good viability of *Aspergillus fumigatus* 293 biofilm (24 h)

同样地,我们利用软件三维重建 24 h 的黄曲霉 BMU 0394Q、土曲霉 BMU 00802 和黑曲霉 BMU 04689 生物膜的立体结构,观察其结构特征(图片未显示)。结果显示,成熟的黄曲霉、土曲霉和黑曲霉生物膜是由细胞外基质包裹的有序排列的菌丝形成的复杂立体结构。将 488 nm 和 633 nm 两个波长下的图像叠加以后,生物膜中的菌丝发出黄色的荧光,说明生物膜中菌丝的活力很好。

3 讨论

已有研究表明真菌生物膜的形成过程与细菌生物膜类似^[2,14]。不同真菌的生物膜形成过程不尽相同,但大致可分为几个步骤:①菌体黏附至合适的底物。②形成微菌落,微菌落融合并形成生物膜的基底层。③产生细胞外基质,逐渐成熟形成三维立体结构。④生物膜子代细胞的播散^[14-19]。

本试验结果使我们初步了解了烟曲霉生物膜的形成过程和结构特征。即孢子黏附(4 h),孢子萌芽(8 h),菌丝延长相互连接形成单细胞层(10~12 h),菌丝缠绕形成多层立体结构(16~20 h),最后形成菌丝有序排列、具有复杂的三维立体结构特征的多细胞菌落。本研究同时利用钙荧光白染色技术证实了细胞外基质的存在,试验结果和已有报道类似^[13]。

本试验同时证明黑曲霉在体外也可以形成生物膜,其形成过程与 Villena 等的报道类似^[20]。除此之外,我们还发现,黄曲霉和土曲霉也有类似的发育过程,只要在适合的底物上,其孢子也会发生黏附、萌芽、菌丝延长、直至形成菌丝有序排列的三维立体结构并产生细胞外基质。这说明黄曲霉和土曲霉也能形成典型意义的生物膜。

总之,烟曲霉、黑曲霉、黄曲霉和土曲霉在体外可以形成典型的生物膜:即菌丝相互黏附形成的有结构的微生物群落;菌丝有序分布;菌丝周围有细胞外基质的包裹。曲霉生物膜在体外的形成过程

与其他真菌生物膜类似,了解其形成特征有助于早期干预以防止曲霉生物膜的形成。

参考文献

- [1] Costerton JW, Lewandowski Z, Calkwell DE, et al. Microbial biofilms [J]. *Annu Rev Microbiol* 1995, 49 (1): 711-745
- [2] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces [J]. *Emerg Infect Dis* 2002, 8 (9): 881-890
- [3] Chandra J, Patel JD, Li J, et al. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms [J]. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71 (12): 8795-8801
- [4] Emerson R J, Camesano TA. Nanoscale investigation of pathogenic microbial adhesion to a biomaterial [J]. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70 (10): 6012-6022
- [5] Ranage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem [J]. *FEMS Yeast Res* 2006, 6 (7): 979-986
- [6] Chandra J, Mukherjee PK, Leitch SD, et al. Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro* [J]. *J Dent Res* 2001, 80 (3): 903-908
- [7] Denning DW. Invasive aspergillosis [J]. *Clin Infect Dis* 1998, 26 (4): 781-803
- [8] Kontoyannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002, 21 (3): 161-172
- [9] Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, et al. An extracellular matrix glue together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus* [J]. *Cell Microbiol* 2007, 9 (6): 1588-1600
- [10] Loussert C, Schmidt C, Prevost MC, et al. *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus* [J]. *Cell Microbiol* 2010, 12 (3): 405-410
- [11] Ranage G, Vandewalle K, Wickes BL, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans* [J]. *Rev Iberoam Microbiol* 2001, 18 (4): 163-170
- [12] Ranage G, Saville SP, Thomas DP, et al. *Candida* biofilms: an update [J]. *Eukaryot Cell* 2005, 4 (4): 633-638
- [13] Mowat E, Butcher J, Lang S, et al. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus* [J]. *J Med Microbiol* 2007, 56 (Pt 9): 1205-1212

- [14] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, et al Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development architecture and drug resistance [J]. J Bacteriol 2001, 183 (18): 5385-5394
- [15] Al-Fattani MA, Douglas LJ Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents [J]. Antimicrob Agents Chemother 2004, 48 (9): 3291-3297
- [16] Baillie GS, Douglas LJ Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B [J]. Antimicrob Agents Chemother 1998, 42 (8): 2146-2149
- [17] Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I et al *Candida albicans* biofilms a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns [J]. Eukaryot Cell 2004, 3 (2): 536-545.
- [18] Nkawa H, Jin C, Makhlis S, et al Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers *in vitro* [J]. J Oral Rehabil 2003, 30 (3): 243-250
- [19] Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective [J]. Curr Opin Microbiol 2006, 9 (6): 588-594.
- [20] Villena GK, Gutierrez-Conea M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities [J]. Lett Appl Microbiol 2007, 45 (3): 231-237.

[收稿日期] 2010-09-17

[本文编辑] 卫凤莲

• 消息 •

(上接第 82 页)

努力提高学员的实践操作能力是本讲习班的特色。由华西医院实验医学中心具有多年真菌学实验室经验的代亚玲技师及多位博士生组成的带教队伍,经过精心准备,给学员提供了包括真菌实验室基础、常规操作及常见真菌的镜下观察等实习,内容丰富、形式多样,密切结合讲课内容,对所学的理论知识及时得到深入理解和消化,受到学员好评,纷纷表示极大的加深了对医学真菌学的直观认识。

参班的正式学员共 49 人,包括皮肤性病科临床医师 40 人、在读博士、硕士研究生 6 人和综合医院检验师 3 人。学员来自全国 16 个省、市、自治区,省外学员占学员总数的 53.1%,省内和成都市内学员占 46.9%。临床为主的三级医院的占 50%,基层医生占 25.5%,来自大型科、教、研医院的占 24.5%。经过理论和实验考试,学员们都以优异成绩获得国家级 I 类学分 (10 学分) 结业证书。讲习班达到预期目的,学员不仅增长了医学真菌知识和真菌临床检验水平,还接触到真菌学前沿、热点知识,并在科研思维、论文写作、讲演技能等方面均得到很好训练,是一次成功的讲习班。明年《皮肤真菌病基础和临床研究进展讲习班》将迎来第 13 期,期待更多学员来参加。



国家级继续医学教育项目“皮肤真菌病基础和临床研究进展讲习班”部分教授和学员合影 (2011.4.4)