

细胞外基质刚度对细菌菌落生长及药物抗性的影响

卞洋洋, 吕若一, 张文静, 李卓, 张朝晖, 蔡子雯, 孙志刚, 刘晓晔*

北京农学院 动物科学技术学院, 北京 102206

卞洋洋, 吕若一, 张文静, 李卓, 张朝晖, 蔡子雯, 孙志刚, 刘晓晔. 细胞外基质刚度对细菌菌落生长及药物抗性的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2854-2866.

BIAN Yangyang, LÜ Ruoyi, ZHANG Wenjing, LI Zhuo, ZHANG Zhaohui, CAI Ziwen, SUN Zhigang, LIU Xiaoye. Extracellular matrix stiffness influences colony growth and antibiotic resistance of bacteria[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2854-2866.

摘要:【背景】病原体侵入宿主细胞的感染过程受到许多因素调控, 其中细胞外基质刚度是宿主细胞普遍具备并调控细胞功能的重要因素, 然而其是否对病原菌侵袭宿主细胞后的生长产生影响仍不明确。【目的】探讨细胞外基质刚度对细菌菌落生长、群体结构及抗生素敏感性的影响。【方法】通过聚丙烯酰胺凝胶模拟不同的细胞外基质刚度, 观察并分析细菌在不同刚度基底上的菌落形成情况。利用显微镜对培养的菌落进行观察, 并通过软件处理图像进一步分析研究结果。【结果】细胞外基质刚度大的情况下细菌菌落生长较大; 使用抗生素后细菌菌落边缘密度更容易在细胞外基质刚度较小的聚丙烯酰胺凝胶上变小, 而不易在细胞外基质刚度较大的类组织水凝胶上变小。【结论】细胞外基质刚度的增加促进了细菌的黏附和菌落形成, 进而改变药物渗透和细菌存活率。研究细胞外基质刚度在细菌生长和药物抗性中的作用机制, 对于开发新型抗菌治疗策略具有重要意义。**关键词:** 细胞外基质刚度; 聚丙烯酰胺凝胶; 菌落形态; 药物抗性

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1801103); 国家自然科学基金(32202864); 北京市教育委员会科学研究计划(KM202310020006); 北京市科学技术协会青年人才托举工程(BYESS2023192); 市属高校分类发展都市农林特色教师队伍建设项目(11000024T000002961733)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1801103), the National Natural Science Foundation of China (32202864), the Scientific Research Plan of Beijing Municipal Education Commission (KM202310020006), the Young Elite Scientists Sponsorship Program by Beijing Association for Science and Technology (BYESS2023192), and the Classification and Development of Urban Agriculture and Forestry Characteristic Teacher Team in Municipal Universities (11000024T000002961733).

*Corresponding author. E-mail: xiaoyeliu@bua.edu.cn

Received: 2024-09-16; Accepted: 2024-11-30; Published online: 2025-01-02

Extracellular matrix stiffness influences colony growth and antibiotic resistance of bacteria

BIAN Yangyang, LÜ Ruoyi, ZHANG Wenjing, LI Zhuo, ZHANG Zhaohui, CAI Ziwen, SUN Zhigang, LIU Xiaoye*

Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract: [Background] The process of pathogen invasion into host cells is regulated by various factors, among which extracellular matrix stiffness is a key factor that modulates host cell functions. However, the influence of extracellular matrix stiffness on the growth of pathogens after they invade host cells remains unclear. [Objective] To investigate how extracellular matrix stiffness affects colony growth, population structure, and antibiotic sensitivity of bacteria. [Methods] Polyacrylamide gels were used to mimic varying degrees of extracellular matrix stiffness, and bacterial colony formation on substrates of different stiffness was observed and analyzed. Microscopy was used for observation of bacterial colonies, and image processing software was employed for further analysis. [Results] Bacterial colonies grew larger in the case of higher extracellular matrix stiffness. After the application of antibiotics, the density at the edges of bacterial colonies was more likely to decrease on polyacrylamide gels with lower extracellular matrix stiffness, whereas it was less likely to decrease on tissue-like hydrogels with higher extracellular matrix stiffness. [Conclusion] An increase in extracellular matrix stiffness promotes bacterial adhesion and colony formation, which alters antibiotic penetration and bacterial survival. Understanding the role of matrix stiffness in the growth and antibiotic resistance of bacteria is crucial for developing new antimicrobial treatment strategies.

Keywords: extracellular matrix stiffness; polyacrylamide gel; colony morphology; antibiotic resistance

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的物理特性涵盖了基质的刚度、孔隙率、不可溶性、空间结构分布、取向(拓扑形态)等多个方面。这些特性共同作用,赋予细胞外基质维持组织结构完整性的功能,并显著影响细胞的生物学行为及其对微环境变化的反应^[1]。其中基质刚度作为组织和细胞的重要力学特性之一^[2-3],通常使用弹性模量来对其进行衡量。细胞外基质刚度在疾病发展过程中发挥重要作用^[4],当细菌感染宿主时常常会定殖于不同组织器官,而不同的组织器官具有特定的细胞外基质刚度,所以我们推测细菌感染宿主的能力可能同组织

器官的表面刚度有关。有研究发现细菌在感染宿主的过程中,首先会与细胞外基质、宿主细胞或邻近细菌接触,并通过相应的生理和行为来响应这些刺激促进细菌对宿主细胞表面的持续附着^[5]。细胞外基质刚度对宿主细胞的影响已经进行了许多研究^[6-7],并且有研究发现连接ECM-整合素-细胞骨架的许多参与机械转导的成分已被许多实验数据所证实,整合素通过其胞质尾部将ECM成分与其胞外结构域、细胞骨架和信号蛋白结合,在ECM和细胞骨架之间提供跨膜连接,将化学和机械信号传入和传出细胞^[8-9],表明基质刚度是细胞外基质中一个重要

的调节信号。细菌是生存在机械的世界里^[10], 细菌可以感知到化学、热和机械信号, 以及电场和磁场, 并对其做出反应。对细菌在不同刚度条件下的生长状况进行探究可以加深对影响细菌生长因素的认识, 为临床抑制或杀灭细菌提供参考。由于传统的琼脂培养基刚度是固定的, 无法根据需要调节其基质刚度, 从而无法模拟细菌黏附定殖在不同刚度组织器官表面后的生长速度及菌落形态的变化, 所以需要具有可调节刚度的化学材料模拟组织细胞的基质刚度, 例如大脑细胞外基底刚度约 0.3–1.0 kPa, 肠道细胞外基底刚度约 10–20 kPa, 牙龈细胞外基底刚

度约 100 kPa^[11] (图 1)。水凝胶是由凝胶单体通过化学或物理交联的方式形成的具有亲水性网状结构的聚合物, 是一种高吸水、高保水、质地柔软、类似于生物体组织的材料^[12]。聚丙烯酰胺水凝胶可以很容易地调节到细胞生理环境的刚度范围, 即从几百帕斯卡到几万帕斯卡^[13], 可为细胞培养中的各种细胞类型提供结构支持, 而且水凝胶是与细菌细胞相互作用的合适环境^[14-15]。因此, 本研究拟利用聚丙烯酰胺凝胶在体外模拟细菌在宿主体内不同侵袭部位的生长状况, 通过对体外模拟条件下细菌菌落变化的研究, 以为细菌感染宿主的临床研究提供参考。

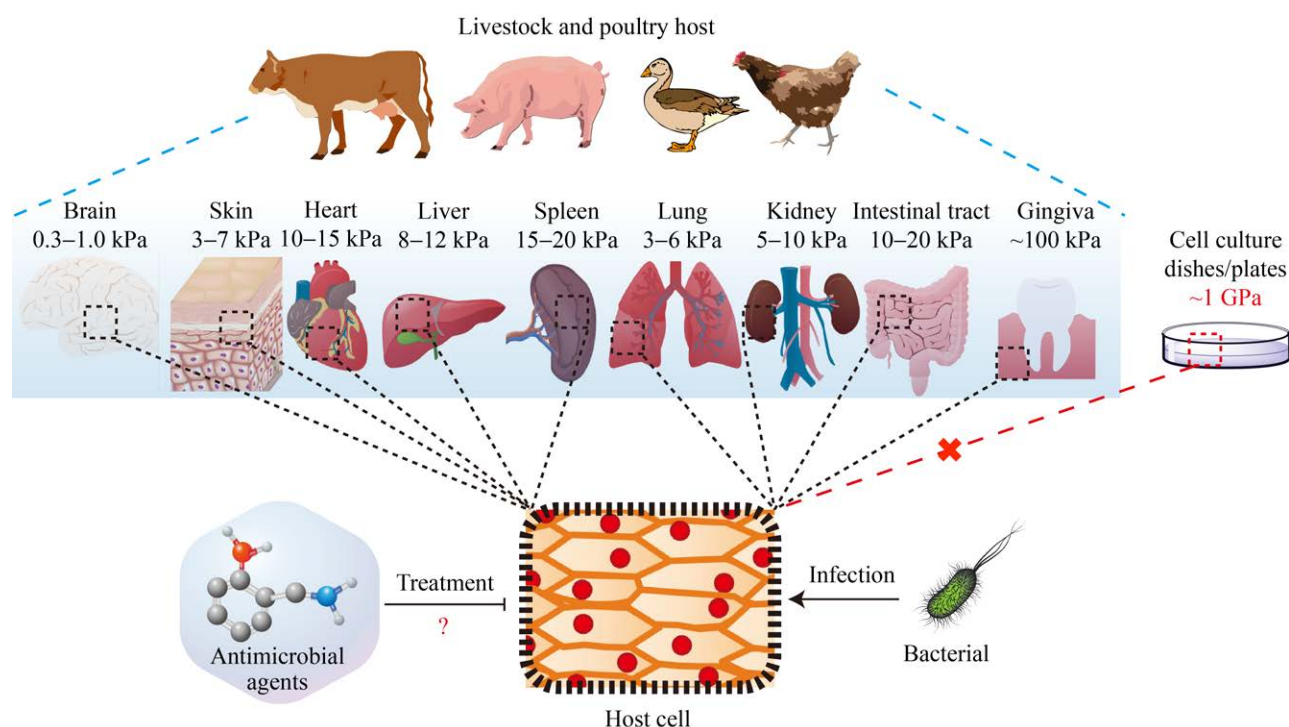


图 1 培养基刚度与宿主体内各组织器官的细胞外基质刚度对比 脑组织的表面刚度为 0.3–1.0 kPa, 皮肤组织的表面刚度为 3–7 kPa, 心、肝、脾、肺、肾的组织表面刚度均小于 20 kPa, 肠道的表面刚度为 10–20 kPa, 牙龈组织的表面刚度在 100 kPa 左右。而培养皿的表面刚度为 GPa 级别, 与组织细胞相差了 10^6 倍。

Figure 1 The stiffness of the culture medium compared to the extracellular matrix stiffness of various tissues and organs within the host. The surface stiffness of brain tissue is 0.3–1.0 kPa, the surface stiffness of skin tissue is 3–7 kPa, the surface stiffness of heart, liver, spleen, lung and kidney tissue is less than 20 kPa, the surface stiffness of intestinal tract is 10–20 kPa, and the surface stiffness of gingival tissue is about 100 kPa. However, the surface stiffness of the cell culture dish was GPa grade, which was 10^6 times different from that of the tissue cells.

1 材料与方 法

1.1 样品

本实验所用的菌株信息见表 1。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 肉汤培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。水凝胶培养基的配制按照表 2 进行。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) (0.01 mol/L), 武汉赛维尔生物科技有限公司。丙烯酰胺、Bis 丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)、3-氨基丙基三甲氧基硅烷(加纯水配制成 1:24 溶液)、聚二甲基硅氧烷、丙酮以及用 PBS 稀释的 0.5%戊二醛、氨苄西林, 阿拉丁(上海)生化科技股份有限公司。IX2-1LL100 型生物显微镜(日本奥林巴斯公司)、DSPM-358 型低温生化培养箱(宁波江南仪器厂)、THZ-D 台式恒温振荡器

(江苏太仓市实验设备厂)。

1.3 不同刚度水凝胶基底的配制

丙烯酰胺水凝胶主要依赖于丙烯酰胺与 Bis-丙烯酰胺在 TEMED 和过硫酸铵的作用下聚合形成聚丙烯酰胺凝胶。利用不同浓度的 40%丙烯酰胺溶液可以制备出具有不同刚度的水凝胶基底。不同的丙烯酰胺配比会导致相应的基底刚度变化, 如表 2 所示^[22], 这些不同的刚度可以用来模拟器官组织的力学微环境。

玻片的活化: 将玻片放入玻璃培养皿中并加入适量甲醇, 放置摇床上 5 min, 清洗结束后待玻片充分晾干后进行第 2 次清洗。在玻片培养皿中加入适量 3-氨基丙基三甲氧基硅烷溶液和丙酮, 待玻片表面混合液干燥后加入纯水进行清洗, 然后加入 0.5%戊二醛(用 PBS 配制) 30 min。最后用纯水清洗, 晾干后备用。

表 1 细菌信息

Table 1 Bacterial information

分类	菌株	来源
Classify	Strain	Source
革兰氏阳性 细菌	蜡样芽孢杆菌 NVH0075/95 <i>Bacillus cereus</i> NVH0075/95	本实验室 Our lab
Gram positive bacteria	枯草芽孢杆菌 ATCC 6051 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	美国典型菌种保藏中心 American Typical Strain Collection Center (ATCC)
	枯草芽孢杆菌 CAU21 <i>Bacillus subtilis</i> CAU21	本实验室 Our lab
	单核增生李斯特氏菌 ATCC 19115 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	赠送
	金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Gain as a gift 美国典型菌种保藏中心 ATCC
革兰氏阴性 细菌	大肠杆菌 GFP-25922 (含有内源性 GFP 绿色荧光) <i>Escherichia coli</i> GFP-25922 (endogenously expressing GFP, green fluorescence)	本实验室 Our lab
Gram negative bacteria	大肠杆菌 ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	美国典型菌种保藏中心 ATCC
	肺炎克雷伯氏菌 1202 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 1202	本实验室 Our lab
	铜绿假单胞菌 PAO1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	本实验室 Our lab
	鼠伤寒沙门氏菌 1344 <i>Salmonella typhimurium</i> 1344	赠送
	副溶血弧菌 ATCC 17802 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Gain as a gift 美国典型菌种保藏中心 ATCC

表2 水凝胶形成和聚合条件

Table 2 Conditions for hydrogel formation and polymerization

杨氏模量 Young's modulus (kPa)	体积 Volume (%)	2.5% LB 肉汤 2.5% LB broth (μL)	40%丙烯酰胺 40% acrylamide (μL)	2% Bis-丙烯酰胺 2% Bis-acrylamide (μL)	过硫酸铵 Ammonium persulfate (μL)	四甲基乙二胺 Tetramethylethylenediamine (μL)
6.29	10	756.50	198	40	5	0.50
10.14	20	578.50	400	16	5	0.50
19.61	10	644.50	190	160	5	0.50
32.29	15	636.50	297	61	5	0.50
51.41	20	441.50	392	161	5	0.50
69.75	15	464.50	289	241	5	0.50
93.46	15	352.50	282	360	5	0.50
142.91	20	136.50	377	481	5	0.50

水凝胶培养基配制方法如下：首先将 2.5% LB 肉汤、40%丙烯酰胺、2% Bis-丙烯酰胺按照所需体积加入到离心管中，最后再加入四甲基乙二胺和过硫酸铵并吹打混匀。随即吸取适量的水凝胶培养基至活化的玻片上，用镊子夹取另一玻片放在含有水凝胶培养基的玻片上，打开超净工作台紫外灯照射 30 min，等水凝胶交联成型后备用。

氨苄西林溶液配制为 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于枯草芽孢杆菌 ATCC 6051、CAU21 和单核增生李斯特氏菌^[16-17]、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于肺炎克雷伯菌^[18]、450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于铜绿假单胞菌^[19]、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于鼠伤寒沙门氏菌^[20]、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于副溶血弧菌^[21]进行观察氨苄西林对细菌菌落的作用。

1.4 细菌在不同细胞外基底刚度上生长速度的观测

将 GFP-25922 等量接入到不同刚度水凝胶基底上，4 h 后记录大肠杆菌生长的图片，观察大肠杆菌在不同刚度水凝胶上生长的荧光图像并定量统计大肠杆菌生长数量，随机选择空白凝胶作为对照。

1.5 细菌菌落在不同刚度培养基上的生长状况

在不同刚度类组织水凝胶上将 5 株革兰氏阳性菌和 5 株革兰氏阴性菌分别接种于软基底 (10.14 kPa) 和硬基底 (32.29 kPa) 上，观察细菌菌

落的生长形态。所应用细菌具体信息如表 1 所示。1.3 中制备的类组织界面的水凝胶用于研究大肠杆菌在不同刚度水凝胶上生长数量，为观察菌落在不同刚度界面的生长形态，将表 1 中的细菌接种在 10.14 kPa 和 32.29 kPa 刚度水凝胶上。所有细菌接种到水凝胶培养基上后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 12 h，随机选择空白凝胶作为对照。使用 ImageJ 软件对菌落沿某一路径进行分析，选择“Straight Line”工具绘制所需路径，然后点击“Analyze”菜单栏下的“Plot Profile”即可得到沿某一路径的灰度值分析图。

1.6 含有氨苄西林的培养基上的细菌生长状况

从 5 株革兰氏阳性菌中选取 3 株菌，从 5 株革兰氏阴性菌中选取 4 株菌分别接种在添加氨苄西林的软 (10.14 kPa)、硬 (32.29 kPa) 水凝胶基底上，对添加氨苄西林前、后菌落生长形态进行观察，随机选择空白凝胶作为对照。使用显微镜对菌落整体进行观察后，增大显微镜倍数对菌落边缘进行观察记录。

2 结果与分析

2.1 细胞外基质刚度促进细菌增殖及增加菌落形态大小

在所选基底刚度范围内，随着基底刚度的增大，大肠杆菌在水凝胶培养基上的生长速度加

快,体现在大肠杆菌的菌落数量增多(图 2A–2H)。图 2I 是对图 2A–2H 中大肠杆菌菌落个数的量化图。这表明大肠杆菌的生长速度与水凝胶基底刚度大小有关。图 2I 发现大肠杆菌的生长速度随着水凝胶基底刚度的增加整体呈现上升的趋势,也就是说在刚度较大的水凝胶基底上大肠杆菌生长速度较快。

将等量细菌接种到软(10.14 kPa)、硬(32.29 kPa)水凝胶基底上,培养相同时间后观察菌落形态大小(图 3A–3B)。对软、硬水凝胶基底上生长的细菌菌落的面积大小进行统计分析,结果显示所有细菌在软、硬水凝胶基底上菌落面积都具有显著性差异,并且所有细菌菌落均在硬水凝胶基底上具有较大面积(图 3C)。这进一步证明了细胞外基质刚度会促进细菌增殖并增大菌落形态。

2.2 细胞外基质刚度影响细菌菌落形态变化

选择生长形态在类组织水凝胶上变化较大的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*),对其菌落不同区域进行灰度值分析。结果显示,枯草芽孢杆菌在软基底培

养基上的菌落形态较为不规则且边缘松散,而在硬基底培养基上菌落呈现明显的分枝结构而且部分边缘区域的密度高于中心区域(图 4A)。大肠杆菌菌落中心部分的灰度值高于边缘部分(图 4B)。

2.3 细菌在添加氨苄西林的硬基底培养基上的菌落变化小

在软(10.14 kPa)和硬(32.29 kPa)基底培养基上接种 7 株细菌并培养相同时间,然后在培养基中添加氨苄西林。氨苄西林对软、硬基底上菌落的影响见图 5。一株枯草芽孢杆菌在软基底上菌落边缘扩散较大,而另一株在硬基底上菌落边缘的黑色区域较多。单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)在软、硬基底上菌落的黑色区域均有不同程度的变浅。肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)在硬基底上的菌落边缘出现局部扩散。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在 2 种基底上的菌落均明显缩小且边缘扩散显著。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)在 2 种基底上的菌落黑色区域加深。副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)在软基底上菌落边缘的扩散比在硬基底上更为明显。

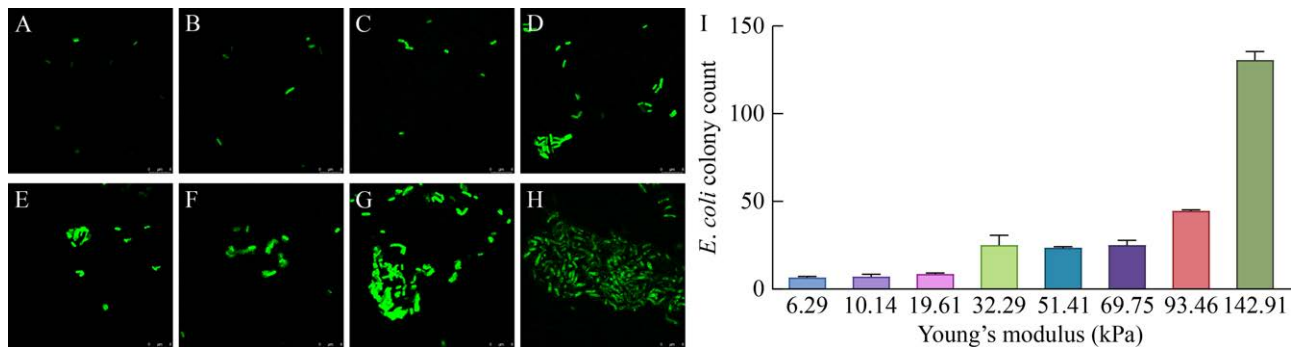


图 2 GFP-25922 在不同基底刚度水凝胶上的生长速度观测 A–H: GFP-25922 在不同刚度水凝胶上生长的荧光图(A: 6.92; B: 10.14; C: 19.61; D: 32.29; E: 51.41; F: 69.75; G: 93.46; H: 142.91)。I: 定量统计 GFP-25922 生长数量图。

Figure 2 Observation of the growth rate of GFP-25922 on hydrogels with different substrate stiffness. A–H: Fluorescence images of GFP-25922 growing on hydrogels with different stiffnesses (A: 6.92, B: 10.14, C: 19.61, D: 32.29, E: 51.41, F: 69.75, G: 93.46, H: 142.91). I: Quantitative statistical plot of the growth number of GFP-25922.

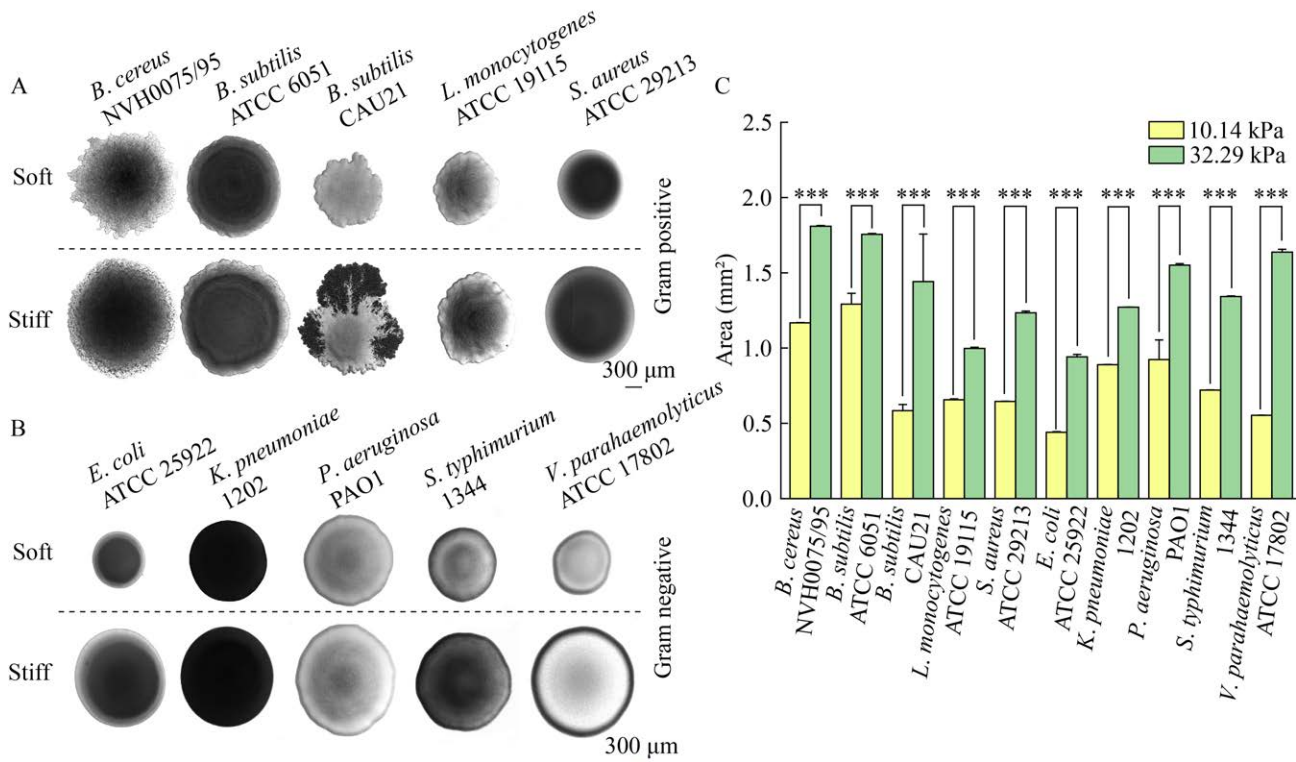


图 3 不同水凝胶基底刚度培养基上细菌生长态势与菌落尺寸大小对比 A: 革兰氏阳性菌; B: 革兰氏阴性菌; C: 定量分析不同基底刚度上细菌菌落面积大小。

Figure 3 Comparison of bacterial growth status and colony size on different hydrogel substrate stiffnesses medium. A: Gram positive bacteria; B: Gram negative bacteria; C: Quantitative analysis of bacterial colony areas on different substrate stiffnesses. ***: $P < 0.001$.

选取菌落大小变化较大的 6 株菌落, 使用显微镜观察软、硬培养基基底上菌落的边缘部分, 发现枯草芽孢杆菌 ATCC 6051、铜绿假单胞菌、副溶血弧菌均在软基底上菌落边缘灰度变化较大而在硬基底上变化较小, 其中以枯草芽孢杆菌 ATCC 6051 菌落边缘变化最为显著(图 6)。

3 讨论

病原菌感染宿主受很多因素的调控^[23]。基质刚度也是调节细菌生长的一个参数^[24]。本研究的创新性在于利用当下具有可调节机械刚度的水凝胶——聚丙烯酰胺凝胶^[25]研究表面机械刚度对细菌菌落生长的影响。选择 10.14 kPa 刚度大小是由于动物体内各组织器官刚度大多在

10 kPa 左右, 比如心脏、肝脏、肾脏等; 选择 32.29 kPa 是由于肝脏发生硬化后细胞外基质刚度可能会达到 34.3 kPa^[26]。因此, 模拟在正常与病理条件下器官基质刚度变化对细菌的生长能力的影响。在培养基上接种细菌后菌落正常增殖并扩张说明聚丙烯酰胺凝胶具有良好的生物相容性, 适用于细菌培养。

本研究结果与大肠杆菌在基底刚度大的表面上菌落扩散更大相一致^[27]。更有研究证实大肠杆菌在聚二甲基硅氧烷刚性大的表面上的比刚性较小表面上运动性更强, 进而表现为菌落扩散更快, 菌落生长更大^[28], 尽管这项研究与本研究所用的培养基不同, 但也表明了基底刚度大的界面会导致大肠杆菌菌落生长更大。较高的基底刚度可能更有利于细菌黏附^[29-30]定殖

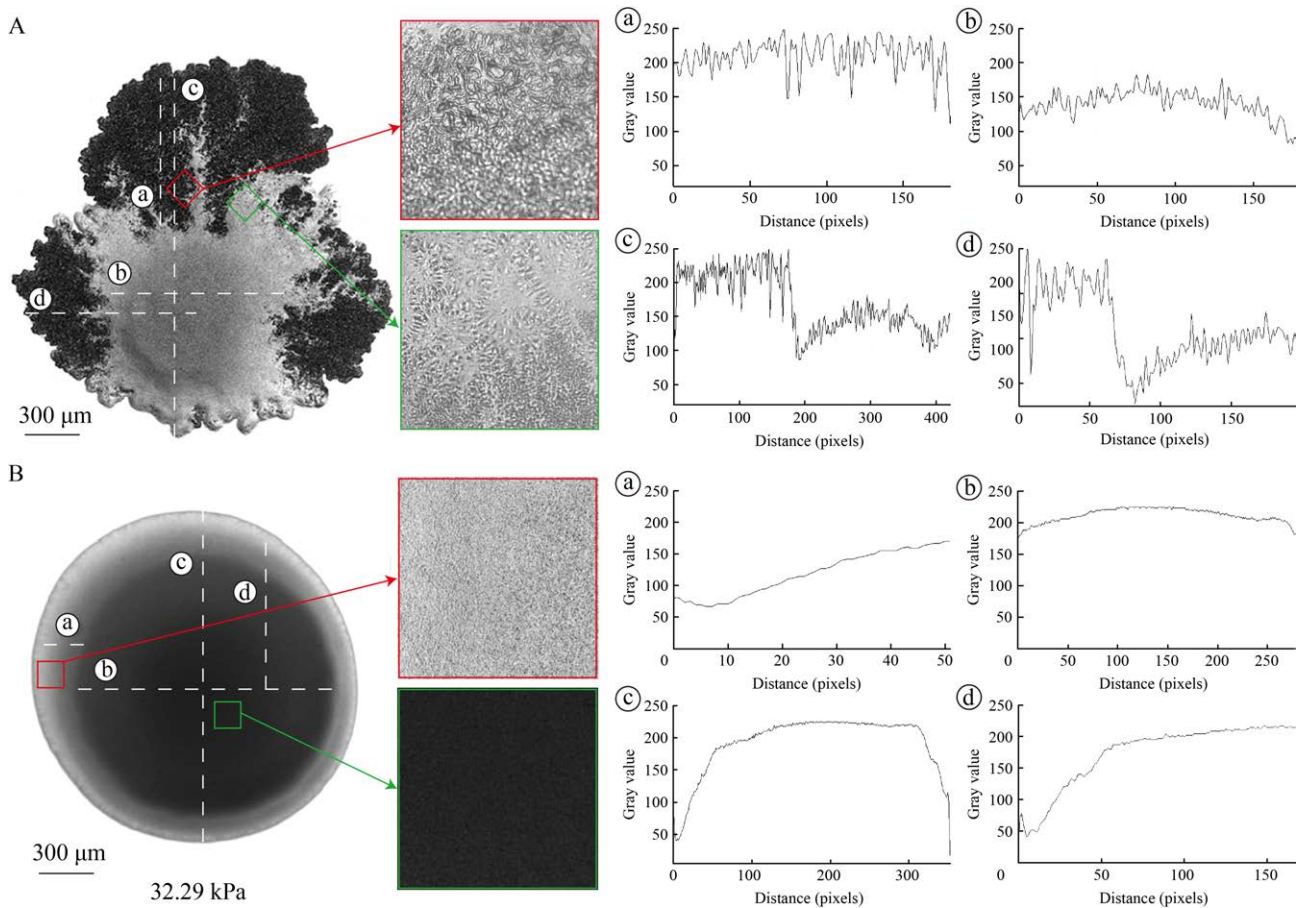


图 4 枯草芽孢杆菌和大肠杆菌在硬基底培养基上的菌落致密度、形态及灰度值统计图 A: 枯草芽孢杆菌 CAU21; B: 大肠杆菌 ATCC 25922。颜色从黑色至灰色表示菌落密度逐渐减小, 用 ImageJ 软件分析菌落灰度值变化。细菌菌落图中圈内 a、b、c、d 表示沿着选定的虚线路径进行灰度值变化趋势分析, 右侧圈内字母 a、b、c、d 为左侧细菌菌落灰度值的量化图。

Figure 4 Statistical chart of colony density, morphology, and grayscale values of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* on stiff substrate medium. A: *B. subtilis* CAU21; B: *E. coli* ATCC 25922. The color gradient from black to gray indicates a gradual decrease in colony density, colony grayscale values were analyzed using ImageJ software. In the bacterial colony image, the letters a, b, c, and d within the circle indicate the selected dashed-line paths along which grayscale intensity profiles were analyzed. The corresponding graphs on the right, also labeled a, b, c, and d, represent the quantified grayscale intensity values of the bacterial colonies along these respective paths.

而加快细菌的生长速度, 进一步导致菌落扩散加快。我们发现在基底刚度大的培养基上枯草芽孢杆菌菌落部分边缘密度大于菌落中央的细菌密度, 而在基底刚度小的水凝胶培养基上菌落边缘与菌落中央灰度值差别较小; 大肠杆菌无论在基底刚度大或小的水凝胶培养基上均是

菌落边缘灰度值小于菌落中央。此结果进一步证实了细菌菌落的形态以及大小与培养基刚度大小有关, 并提示在生理条件下细胞外基质刚度可能会对细菌生长速率及菌落大小产生影响。有研究揭示了 ECM 刚度调控细菌内化感染的空间位置、细胞牵引力和细胞骨架动力学之

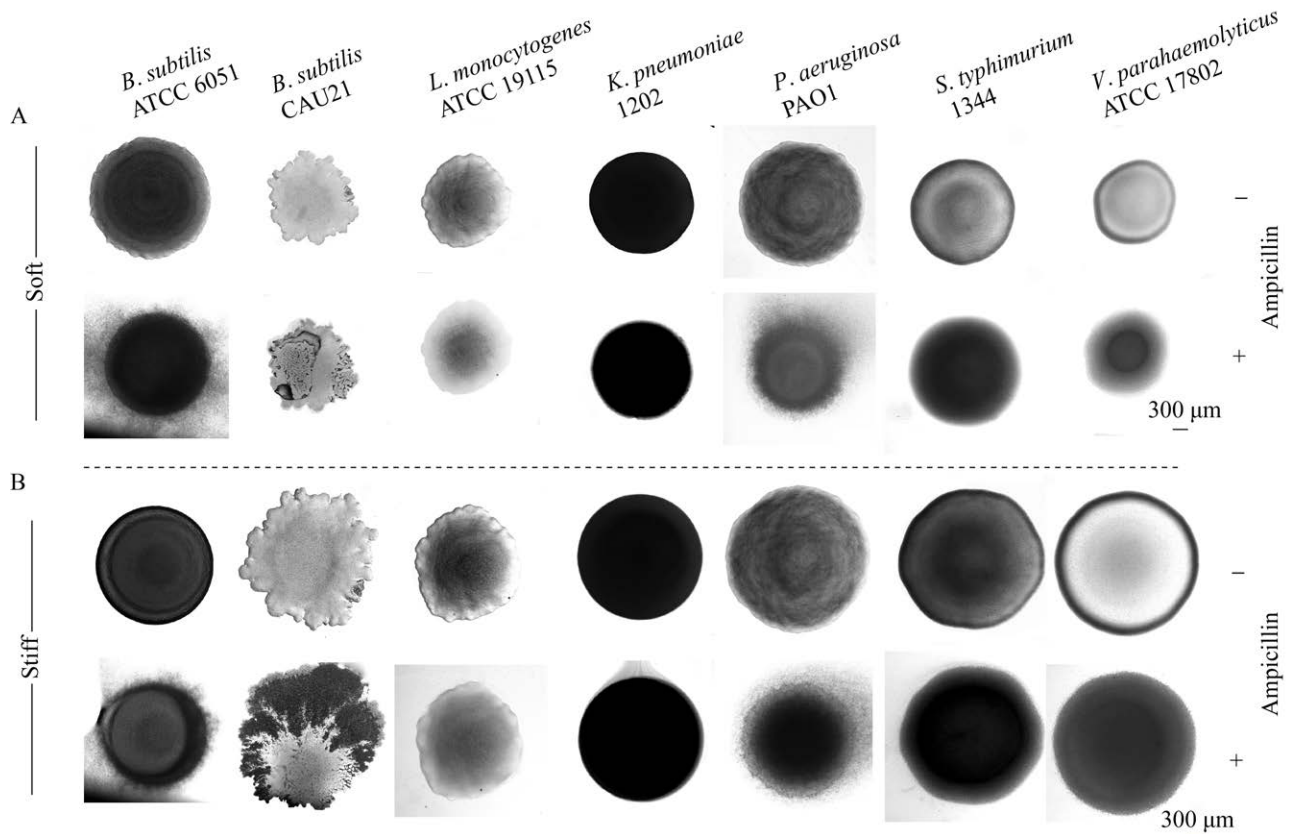


图5 加入氨苄西林后的软(A)、硬基底(B)培养基上7种细菌菌落变化

Figure 5 Changes of seven bacterial colonies on soft (A) and stiff (B) substrate medium after addition of ampicillin.

间的高度相关性^[31], 这应该是生化信号和细胞感觉的机械线索之间交换的结果。另一个有趣的发现在于, ECM刚度的增加这一点提示我们, 在某些病理条件下的组织硬化现象, 例如肝硬化和肺纤维化^[32], 可能会引发潜在的弥漫性感染。此外, 有研究发现更硬的ECM可以加速肝癌细胞的细胞迁移^[33], 这与本研究发现硬基底培养基促进细菌扩散相似, 具体机制需要更进一步地研究。

我们在基底刚度会影响细菌菌落生长的基础上进一步探究抗生素对细菌菌落的影响, 进而将药物在机体内发挥杀菌作用与细胞外基质刚度相关联。有研究表明, 基质的机械特性不仅为细菌群落提供了内聚力, 还在生物膜保护细胞免受流动和捕食的影响中发挥作用^[34]。表

明细胞外基质刚度增大可能会降低细菌生物膜对药物分子的渗透率, 进而表现为基底刚度大的水凝胶培养基上生长的细菌对氨苄西林的抗性增强。然后, 我们又对细菌菌落边缘形态进行放大观察, 结果表明添加抗生素后, 不同菌株在软、硬细菌菌落边缘会发生相似变化且菌落边缘弥散程度变大, 这从侧面证明了氨苄西林对试验所用细菌生长均有杀灭作用, 进而表明基质刚度可能影响细菌群落对氨苄西林的抗性。有研究表明, 相较于浮游状态的细菌, 生物膜内的细胞对抗菌药物杀伤的抵抗力要高出10–1 000倍^[35]。因此, 我们推测细胞外基质的刚度大小会影响细菌生物膜成分或加快生物膜的形成, 从而对细菌起到积极的保护作用。由于细菌群体感应(quorum sensing, QS)不仅可以

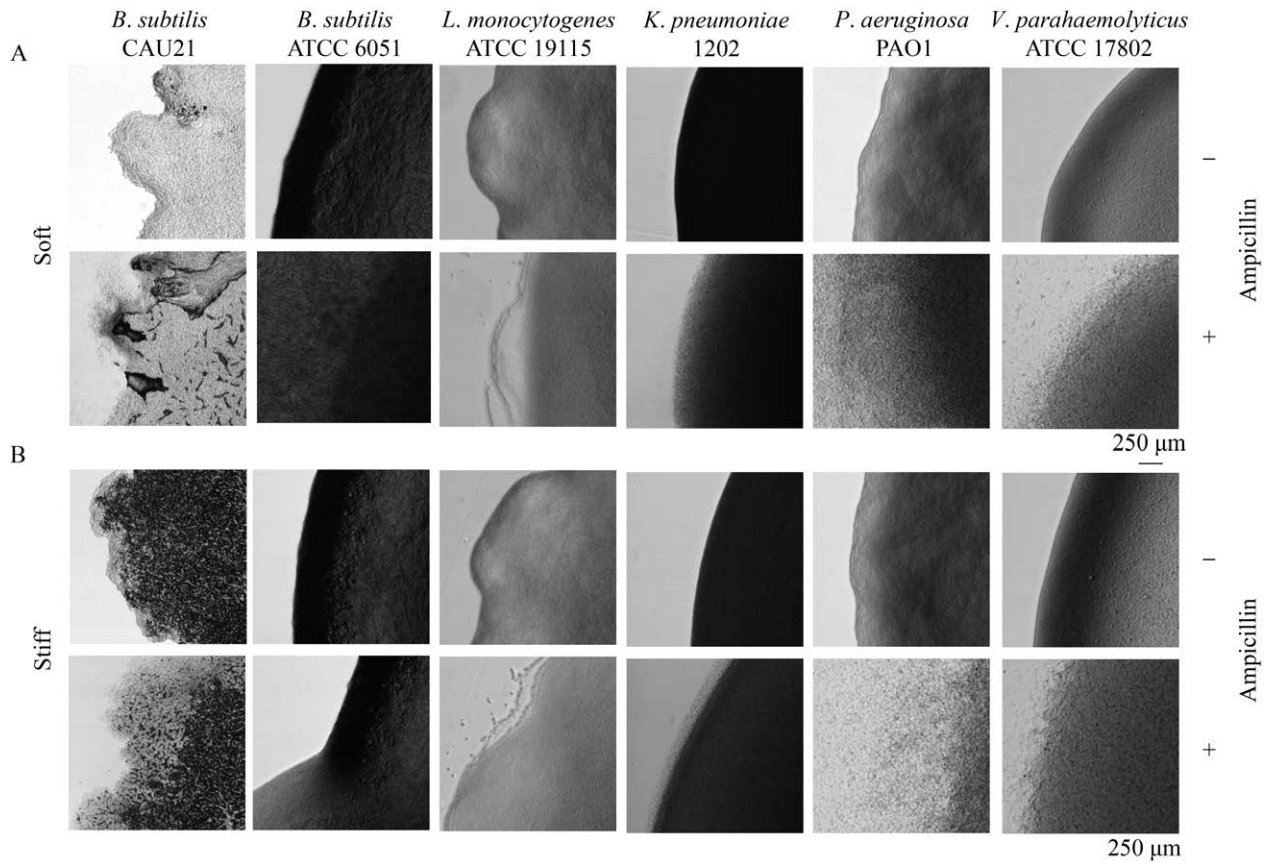


图 6 氨苄西林添加前后 6 株细菌在软基底(A)和硬基底(B)水凝胶培养基上菌落边缘的生长情况

Figure 6 Marginal growth of six bacterial colonies on soft (A) and stiff (B) substrate hydrogel medium under conditions before and after the addition of ampicillin.

通过塑造微生物相互作用来快速响应和适应波动的环境，进而确定微生物群落结构^[18]，还可以控制生物膜发育的不同阶段，包括初始定殖或黏附、细菌聚集、生物膜成熟和细菌分散^[36]，我们推测细胞外基质刚度可能通过影响细菌群体感应而影响细菌生物膜的形成速度。有关基质刚度对细菌药物抗性的影响的具体机制有待后续进一步研究发现。本研究揭示了抗菌药物对于软基底刚度上的感染细胞的治疗效果要优于硬基底，也就是说在较硬的基底上进行抗菌药物治疗的时候很有可能比实际上体内治疗时的药物剂量要大，这一点提示我们，体外进行的抗菌药物治疗试验会将有效治疗的药物浓度放大，这有可能是过度用药导致抗菌药物耐药

性产生的原因之一。此外，基于软基底上感染的细胞更利于抗菌药物治疗，利用骨架解聚剂来软化局部组织，可以辅助抗菌药物提高治疗效果，减少抗菌药物的密集使用。本研究也警示我们在治疗、预防控制临床感染性疾病时应避免抗生素药物的过度使用。

综上所述，本研究对药品研发和临床用药剂量具有重要指导意义。通过避免过度用药可以减少耐药菌株的产生，总的来说，不同细胞外基质刚度的组织或器官遭受细菌感染时，使用抗生素治疗时所需的用药剂量可能会有所不同。抗菌药物的过度使用和滥用不仅加速了细菌耐药的产生和进化，也促进了耐药菌的传播^[37]。本实验所用的聚丙烯酰胺凝胶与细胞外基质在

成分、结构以及功能上仍有较大差别。细胞外基质组成成分包括多种蛋白质和糖蛋白^[38],可表现出复杂的、时间和速率依赖性的机械行为^[39],而聚丙烯酰胺水凝胶则是化学物质之间反应交联组成的网状结构,并不会表现出复杂的机械行为。这些是水凝胶在成分和结构上与细胞外基质的差异。在功能上,聚丙烯酰胺水凝胶在细胞生长中作为物理支撑材料,不受细菌感染阶段的影响而发生较大变化,而细胞外基质在病理条件下可以通过广泛的重塑驱动疾病进展^[38]。这些差别都会导致细胞生长的差异。但本实验只探究细胞外基质刚度变化对细菌菌落变化的影响,其他条件有待深入研究。此外,已有文献利用水凝胶探究刚度大小对细菌黏附能力的影响^[40],因此本研究利用水凝胶进行生物学研究具有可行性。

4 结论

聚丙烯酰胺水凝胶基底可以重塑组织细胞体内生长微环境,利用不同刚度基底培养细菌菌落,可以有效探究细胞外基底刚度对细菌菌落的生长形态、大小及对抗生素敏感性的影响。我们的研究发现硬基底条件下细菌菌落更大且对氨苄西林抗性更强。本研究为抗菌界面的探索和细菌与其附着表面相互作用机制的研究提供了有价值的参考,为细菌在不同刚度表面上生长速度和生物膜形成等研究提供了参考。我们相信推动对细菌生长机制的认识将有助于应对细菌耐药性问题。

作者贡献声明

卞洋洋:研究方法设计与改进,数据收集、分析与解读,撰写初稿;吕若一、张文静:研究方法设计与改进,分析与解读实验结果;李卓、张朝晖:协调进程,参与结果分析讨论;蔡子雯、孙志刚:参与结果分析与解读;刘晓晔:总体思路指导、论文撰写,语言修改和润色,基金项目支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 魏佳赞,姚佳,李汛. 细胞外基质刚度在肝细胞癌中的研究进展[J]. 中国医学物理学杂志, 2021, 38(6): 770-772.
WEI JY, YAO J, LI X. Advances of research on extracellular matrix stiffness in hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2021, 38(6): 770-772 (in Chinese).
- [2] BATASHEVA S, KOTOVA S, FROLOVA A, FAKHRULLIN R. Atomic force microscopy for characterization of decellularized extracellular matrix (dECM) based materials[J]. Science and Technology of Advanced Materials, 2024, 25(1): 2421739.
- [3] JANMEY PA, FLETCHER DA, REINHART-KING CA. Stiffness sensing by cells[J]. Physiological Reviews, 2020, 100(2): 695-724.
- [4] 吕若一,王潇,穆君宇,司晓慧,孙志刚,刘晓晔. 柔性水凝胶细胞筛药基底评估清热凉血中药复方的抗菌效果[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(3): 587-594.
LYU RY, WANG X, MU JY, SI XH, SUN ZG, LIU XY. Evaluation of antibacterial effect of heat-clearing and blood-cooling Chinese medicine compounds using flexible hydrogel cell-substrate for drug-screening[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2024, 44(3): 587-594 (in Chinese).
- [5] LAVENTIE BJ, JENAL U. Surface sensing and adaptation in bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2020, 74: 735-760.
- [6] DONG DL, JIN GZ. YAP and ECM stiffness: key drivers of adipocyte differentiation and lipid accumulation[J]. Cells, 2024, 13(22): 1905.
- [7] LIAO XY, LI X, LIU R. Extracellular-matrix mechanics regulate cellular metabolism: a ninja warrior behind mechano-chemo signaling crosstalk[J]. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2023, 24(2): 207-220.
- [8] CHEN EG, ZENG ZR, ZHOU W. The key role of matrix stiffness in colorectal cancer immunotherapy: mechanisms and therapeutic strategies[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer, 2024, 1879(6): 189198.
- [9] KANCHANAWONG P, CALDERWOOD DA. Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell: ECM adhesions[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 24(2): 142-161.
- [10] NICKERSON CA, McLEAN RJC, BARRILA J, YANG J, THORNHILL SG, BANKEN LL, PORTERFIELD DM, POSTE G, PELLIS NR, OTT CM. Microbiology of human spaceflight: microbial responses to mechanical forces that impact health and habitat sustainability[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2024, 88(3): e0014423.
- [11] SINGH G, CHANDA A. Mechanical properties of whole-body soft human tissues: a review[J]. Biomedical Materials, 2021. DOI: 10.1088/1748-605X/ac2b7a.

- [12] 崔航, 王思琪, 郭世好, 张伟. 水凝胶的制备及应用进展[J]. 化工新型材料, 2021, 49(S1): 47-51.
CUI H, WANG SQ, GUO SH, ZHANG W. Progress in preparation and application of hydrogel[J]. New Chemical Materials, 2021, 49(S1): 47-51 (in Chinese).
- [13] POGODA K, CHARRIER EE, JANMEY PA. A novel method to make polyacrylamide gels with mechanical properties resembling those of biological tissues[J]. Bio-protocol, 2021, 11(16): e4131.
- [14] HO TC, CHANG CC, CHAN HP, CHUNG TW, SHU CW, CHUANG KP, DUH TH, YANG MH, TYAN YC. Hydrogels: properties and applications in biomedicine[J]. Molecules, 2022, 27(9): 2902.
- [15] WU H, SONG LL, YAM JKH, PLOTKIN M, WANG HZ, RYBTKE M, SELIKTAR D, KOFIDIS T, HØIBY N, TOLKER-NIELSEN T, SONG ZJ, GIVSKOV M. Effects of antibiotic treatment and phagocyte infiltration on development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-Insights from the application of a novel PF hydrogel model *in vitro* and *in vivo*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 826450.
- [16] BUCHER T, KEREN-PAZ A, HAUSSER J, OLENDER T, CYTRYN E, KOLODKIN-GAL I. An active β -lactamase is a part of an orchestrated cell wall stress resistance network of *Bacillus subtilis* and related rhizosphere species[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(3): 1068-1085.
- [17] MAĆKIŃ E, KORSÁK D, KOWALSKA J, FELIX B, STASIAK M, KUCHAREK K, ANTOSZEWSKA A, POSTUPOLSKI J. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat food products in retail in Poland[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 358: 109397.
- [18] TSAI YK, FUNG CP, LIN JC, CHEN JH, CHANG FY, CHEN TL, SIU LK. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(4): 1485-1493.
- [19] LI Y, XIA LX, CHEN J, LIAN YL, DANDEKAR AA, XU F, WANG MZ. Resistance elicited by sub-lethal concentrations of ampicillin is partially mediated by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environment International, 2021, 156: 106619.
- [20] KARATZAS KAG, RANDALL LP, WEBBER M, PIDDOCK LJV, HUMPHREY TJ, WOODWARD MJ, COLDHAM NG. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1508-1516.
- [21] LOPATEK M, WIECZOREK K, OSEK J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from raw shellfish in Poland[J]. Journal of Food Protection, 2015, 78(5): 1029-1033.
- [22] DENISIN AK, PRUITT BL. Tuning the range of polyacrylamide gel stiffness for mechanobiology applications[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(34): 21893-21902.
- [23] ZENG XY, ZOU YM, ZHENG J, QIU SY, LIU LL, WEI CY. Quorum sensing-mediated microbial interactions: mechanisms, applications, challenges and perspectives[J]. Microbiological Research, 2023, 273: 127414.
- [24] ZHENG S, BAWAZIR M, DHALL A, KIM HE, HE L, HEO J, HWANG G. Implication of surface properties, bacterial motility, and hydrodynamic conditions on bacterial surface sensing and their initial adhesion[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 643722.
- [25] 覃馨园, 刘海涛, 甘忠桥, 秦建华. 水凝胶材料在类器官研究中的应用进展[J]. 中国科学: 化学, 2024, 54(2): 182-195.
QIN XY, LIU HT, GAN ZQ, QIN JH. Application of hydrogel materials for organoids[J]. Scientia Sinica Chimica, 2024, 54(2): 182-195 (in Chinese).
- [26] CASTÈRA L, VERGNIOL J, FOUCHER J, Le BAIL B, CHANTELOUP E, HAASER M, DARRIET M, COUZIGOU P, de LÉDINGHEN V. Prospective comparison of transient elastography, fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C[J]. Gastroenterology, 2005, 128(2): 343-350.
- [27] ASP ME, HO THANH MT, GERMANN DA, CARROLL RJ, FRANCESKI A, WELCH RD, GOPINATH A, PATTESON AE. Spreading rates of bacterial colonies depend on substrate stiffness and permeability[J]. PNAS Nexus, 2022, 1(1): pgac025.
- [28] VIGUÉ A, VAUTIER D, KAYTOUE A, SENER B, ARNTZ Y, BALL V, BEN MLOUKA A, GRIBOVA V, HAJJAR-GARREAU S, HARDOUIN J, JOUENNE T, LAVALLE P, PLOUX L. *Escherichia coli* biofilm formation, motion and protein patterns on hyaluronic acid and polydimethylsiloxane depend on surface stiffness[J]. Journal of Functional Biomaterials, 2022, 13(4): 237.
- [29] BARAJAS B, KURTZ IS, WALDMAN AJ, SCHIFFMAN JD. Stiffness and oligomer content affect the initial adhesion of *Staphylococcus aureus* to polydimethylsiloxane gels[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2023.
- [30] HUANG LZY, SHAW ZL, PENMAN R, CHEESEMAN S, TRUONG VK, HIGGINS MJ, CARUSO RA, ELBOURNE A. Cell adhesion, elasticity, and rupture forces guide microbial cell death on nanostructured antimicrobial titanium surfaces[J]. ACS Applied Bio Materials, 2024, 7(1): 344-361.
- [31] LIU XY, ZHU K, DUAN XC, WANG PD, HAN YM, PENG WJ, HUANG JY. Extracellular matrix stiffness modulates host-bacteria interactions and antibiotic therapy of bacterial internalization[J]. Biomaterials, 2021, 277: 121098.
- [32] HE AD, HE LZ, CHEN TW, LI XJ, CAO C.

- Biomechanical properties and cellular responses in pulmonary fibrosis[J]. *Bioengineering*, 2024, 11(8): 747.
- [33] ZHANG TC, CHEN JJ, YANG H, SUN XY, OU YR, WANG Q, EDDERKAOU M, ZHENG SJ, REN F, TONG Y, HU R, LIU JY, GAO Y, PANDOL SJ, HAN YP, ZHENG XF. Stromal softness confines pancreatic cancer growth through lysosomal-cathepsin mediated YAP1 degradation[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2024, 81(1): 442.
- [34] CONT A, VERMEIL J, PERSAT A. Material substrate physical properties control *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture[J]. *mBio*, 2023, 14(2): e0351822.
- [35] MICHAEL, WATURANGI DE. Antibiofilm activity from endophyte bacteria, *Vibrio cholerae* strains, and actinomycetes isolates in liquid and solid culture[J]. *BMC Microbiology*, 2023, 23(1): 83.
- [36] HEMMATI F, REZAEI MA, EBRAHIMZADEH S, YOUSEFI L, NOURI R, KAFIL HS, GHOLIZADEH P. Novel strategies to combat bacterial biofilms[J]. *Molecular Biotechnology*, 2021, 63(7): 569-586.
- [37] 李胜男, 倪文涛. 细菌耐药水平的检测及监测[J]. *临床内科杂志*, 2024, 41(3): 155-159.
- LI SN, NI WT. Detection and monitoring of bacterial resistance levels[J]. *Journal of Clinical Internal Medicine*, 2024, 41(3): 155-159 (in Chinese).
- [38] KARAMANOS NK, THEOCHARIS AD, PIPERIGKOU Z, MANOU D, PASSI A, SKANDALIS SS, VYNIOS DH, ORIAN-ROUSSEAU V, RICARD-BLUM S, SCHMELZER CEH, DUCA L, DURBEEJ M, AFRATIS NA, TROEBERG L, FRANCHI M, MASOLA V, ONISTO M. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix[J]. *The FEBS Journal*, 2021, 288(24): 6850-6912.
- [39] CHAUDHURI O, COOPER-WHITE J, JANMEY PA, MOONEY DJ, SHENOY VB. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour[J]. *Nature*, 2020, 584(7822): 535-546.
- [40] BAWAZIR M, DHALL A, LEE J, KIM B, HWANG G. Effect of surface stiffness in initial adhesion of oral microorganisms under various environmental conditions[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2023, 221: 112952.