

文章编号:1000-5404(2012)09-0821-06

论著

噬菌体 Legendre 的生物学特性及抗耐药结核潜力的初步研究

刘平, 鄢亭亭, 彭丽, 郭述良, 罗永艾 (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院呼吸科)

[摘要] **目的** 研究噬菌体 Legendre 的生物学特性并初步探索其用于抗耐药结核的潜力。**方法** 双层平板法制备 Legendre 的噬菌斑, 观察其特点, 纯化噬菌体, 电镜观察 Legendre 形态; 提取 Legendre 基因组, 限制性内切酶酶切分析确定其核酸类型; 以不同感染复数扩增 Legendre, 找出最佳 MOI 和最小 MOI; 通过一步生长实验找出 Legendre 潜伏期、裂解期和裂解量; 纯化 Legendre 颗粒, 免疫家兔, 获得抗血清, 通过中和反应实验测定 Legendre 以及其他 8 种噬菌体和 Legendre 抗血清之间的吸附反应常数 K 值; 采用单斑法测定 Legendre 的宿主谱; 检测 Legendre 对紫外线、温度、氯仿、酒精、酸碱度的耐受性。**结果** Legendre 的噬菌斑圆形透明, 边界清楚, Legendre 头部呈多面体立体对称, 直径平均为 65 nm, 尾长平均为 215 nm; 基因组核酸能被双链 DNA 内切酶 *EcoR* I, *Hind* III 及 *Bam*H I 切开, 大小约 65 kb; Legendre 最佳 MOI 为 10^{-4} , 最小 MOI 为 10^{-3} , Legendre 对耻垢分枝杆菌极度易感; Legendre 感染宿主菌的潜伏期为 180 min, 裂解期为 120 min, 裂解量为 13; Legendre K 值为 697, Legendre 抗血清对非对应噬菌体的中和活性有差异, 对 DNA III、Bo4、Clark、Sedge、Leo 高, 对 TM4、D29 中和活性较低; Legendre 能裂解耻垢分枝杆菌、结核分枝杆菌标准株、多数临床耐药株; Legendre 对紫外线、温度、氯仿、酒精、酸碱度均敏感。**结论** Legendre 属于长尾噬菌体科, 双链 DNA 噬菌体, 抗原性低, 宿主谱广, 具有抗耐药结核潜力。

[关键词] Legendre; 耻垢分枝杆菌; 结核分枝杆菌; 生物学特性; 耐药结核病

[中图法分类号] R372; R373.9; R520.5

[文献标志码] A

Biological characteristics of mycobacteriophage Legendre and its potentials in drug-resistant tuberculosis control

Liu Ping, Wu Tingting, Peng Li, Guo Shuliang, Luo Yongai (Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the biological characteristics of mycobacteriophage Legendre and explore its anti-drug-resistant tuberculosis potentials. **Methods** Plaque morphological properties of Legendre were observed by double-layer plating, and the ultrastructure of Legendre was observed by electron microscopy. The genome of Legendre was extracted and the type of nucleic acid was identified with restriction enzyme analysis. Legendre was amplified by double-layer agar plate method in different multiplicity of infection (MOI) to find the optimal MOI and the lowest MOI. One step growth experiment was carried out to find the latent period, burst period and burst size of Legendre. The rabbits were immunized with purified Legendre particles to prepare anti-Legendre serum and cross neutralization test was performed to examine the reaction constant K values of Legendre and other 8 phages. The host range of Legendre was examined by single-spot examination. The effect of UV ray, temperature, chloroform, alcohol, pH values on Legendre survival was surveyed. **Results** The plaques of Legendre were transparent and their sizes were about 1 mm in the diameter. There was an isometric head with an average diameter of about 65 nm and a long tail with an average length of about 215 nm in Legendre. Legendre was digested by restriction endonuclease *EcoR* I, *Hind* III and *Bam*H I and the size of genome was about 65 kb. The optimal and lowest MOI of Legendre are 10^{-4} and 10^{-3} , respectively. Legendre was extremely susceptible to *Mycobacterium smegmatis*. The latent period was 180 min, the burst period was 120 min, and the burst size was 13. The K value of Legendre was 697. Legendre, TM4 and D29 were affinity low. Legendre lysed *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and the majority of clinical drug-resistant strains. Legendre was unstable to UV ray, temperature, chloroform, alcohol and pH

[基金项目] “十一五”国家科技重大专项(2008ZX10303)

[通信作者] 郭述良, E-mail: guosl999@sina.com

values. **Conclusion** Legendre is a suitable broad host range and low antigenicity siphoviridae phage which could be used in phage therapy to treat drug-resistant tuberculosis.

[**Key words**] Legendre; *Mycobacterium smegmatis*; *Mycobacterium tuberculosis*; biological characteristics; Drug-resistant Tuberculosis

Supported by the Major Project of "Eleventh Five-year Plan" of National Science and Technology (2008ZX10303). Corresponding author: Guo Shuliang, E-mail: guosl999@sina.com

噬菌体(bacteriophage, phage)侵入宿主细胞后,随即引起宿主细胞裂解,利用这一特性可治疗感染性疾病^[1]。自发现噬菌体以来,研究者就尝试采用噬菌体治疗细菌性感染,但随着抗生物素的出现,已很少开展对噬菌体疗法(phage therapy)的研究。近年来,由于各种耐药性病原菌出现,尤其是广泛耐药结核菌已经到了无药可医的境地,新型抗生物素的研发越来越困难,而噬菌体作为一种抗菌剂,具有特异性强、自我增殖快、来源广等一些其他抗菌剂无法比拟的优点,因此噬菌体疗法重新受到研究者的重视。随着大量噬菌体基因组的测序,研究者对噬菌体的进化史、噬菌体和宿主的相互作用、病原菌的致病性以及噬菌体生态学有了更深的了解,噬菌体疗法的知识背景和技术手段逐渐成熟^[1]。噬菌体疗法主要针对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、葡萄球菌等快生长菌导致的感染,结核分枝杆菌为慢生长细菌,相关研究很少^[1-4],而且结核分枝杆菌为细胞内寄生菌,噬菌体能否杀灭巨噬细胞内结核分枝杆菌对治疗结核病非常关键。本实验通过研究分枝杆菌噬菌体 Legendre 的生物学特征及其与宿主菌相互作用规律,探寻其治疗耐药结核病的潜力。

1 材料与方 法

1.1 菌种来源及培养

耻垢分枝杆菌(CMCC 93202)由中国药品生物制品检定所王国治教授馈赠,结核分枝杆菌标准株 H₃₇Rv (CMCC 93004)购自重庆市肺科医院,分枝杆菌临床分离株自行从本院结核病病人痰中分离(2010年3月至2011年4月)。噬菌体 Legendre, Bo4, Clark, DNA III, 33D, Leo, Sedge 购自加拿大拉瓦尔大学 Félix d'Hérelle 噬菌体中心, D29 由中国药品生物制品检定所王国治教授赠送, TM4 由美国匹兹堡大学 Hatfull 教授赠送。扩增耻垢分枝杆菌时采用 7H9 液体培养基(美国 BD 公司),扩增其他分枝杆菌时采用罗氏培养基(珠海贝索公司),扩增噬菌体时采用双层琼脂固体培养基(美国 BD 公司)。稀释噬菌体采用噬菌体缓冲液(phage buffer, PB),配方为 1.211 g Tris, 1.204 g 硫酸镁, 4 g 氯化钠, 0.1 mmol/L 氯化钙, ddH₂O 980 ml, pH 7.5。与结核分枝杆菌相关的操作均在重庆医科大学附属第一医院生物安全二级(P2)实验室进行。

1.2 Legendre 的培养与形态观察

采用双层琼脂平板培养法扩增 Legendre,次日即可长出单个噬菌斑,观察噬菌斑形态。参照文献[5]的方法,略有改动,扩增、纯化 Legendre,取 20 μl(10¹⁰ pfu/ml)滴于铜网上,自然沉

淀 15 min,用滤纸从侧面吸走多余液体,加 1 滴 20 g/L 磷钨酸(pH 7.0)于铜网上,染色 10 min,用滤纸从侧面吸去染液,干燥后用电镜(Hitachi-7500)观察 20 个视野以上。

1.3 Legendre 核酸的提取及鉴定

纯化 Legendre 颗粒,λ 噬菌体 DNA 提取试剂盒(北京艾比根公司)提取 DNA,定量后用限制性核酸内切酶 EcoR I, Hind III and BamH I(加拿大 Fermentas 公司)酶切基因组核酸,根据酶切图谱鉴定其核酸类型,估计基因组大小。

1.4 Legendre 最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)和最小 MOI

MOI 是指初始感染时加入噬菌体的数量与宿主菌数量的比值。按照不同的感染复数加入 Legendre 和耻垢分枝杆菌,双层平板 37 °C 过夜培养,各点均作双份复板培养取平均值。次日收集噬菌体,梯度稀释测定滴度。产生最高噬菌体滴度的 MOI 为最佳感染复数。噬菌体感染宿主菌 24 h 后,宿主菌完全被裂解时(即培养板完全透明时),最高稀释浓度下的噬菌体与细菌数量的比值为最小感染复数,其大小可用来评价不同菌株对于待测噬菌体的易感性^[6];当最小 MOI < 10⁻² 时为极度易感,即 Legendre 对耻垢分枝杆菌极度易感。

1.5 Legendre 一步生长曲线的绘制

参照文献[7]的方法,略有改动。加入噬菌体及宿主菌使 MOI = 0.1, 37 °C 温育 15 min 后加入 4% 硫酸亚铁铵杀灭未吸附的噬菌体, 13 000 × g 离心 1 min,弃上清, 7H9 液体培养基洗涤 2 次后高倍稀释(10 000 倍),迅速置于 37 °C 大振幅摇床中培养(160 r/min),开始计时,根据预实验结果每 30 分钟取样 100 μl, 13 000 × g 离心 1 min,吸取上清测定噬菌体滴度,各时间点均作双份复管取平均值,实验重复 3 次。0 min 时取样 100 μl 离心后的沉淀与耻垢分枝杆菌混合后铺板,产生的噬菌斑数即为感染初期感染了噬菌体的宿主菌数。根据实测值绘制一步生长曲线,得出噬菌体的潜伏期、裂解期和裂解量。每个被噬菌体感染的宿主菌释放子代噬菌体的平均数称为裂解量:裂解量 = 裂解末期噬菌体数 ÷ 感染初期感染噬菌体的宿主菌数。

1.6 Legendre 抗血清的制备与中和实验

1.6.1 抗血清的制备 参照文献[8],纯化 Legendre 噬菌体颗粒,皮下免疫家兔(新西兰大白兔 3 只, 4 月龄,雄性,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供,符合伦理要求)。经试血测定噬菌体抗血清符合要求(即以 1:100 稀释的抗血清能在 5 min 内中和 90% 以上的噬菌体)后经心脏采血, 4 °C 静置过夜,收集析出的血清,离心除去残余红细胞, 56 °C 水浴 30 min 灭活补体, 0.22 μm 滤器过滤除菌后分装, -20 °C 保存。

1.6.2 吸附 K 值及交叉吸附 K 值的测定 吸附 K 值是抗噬菌体血清与对应噬菌体反应的吸附常数,交叉吸附 K 值是抗噬菌体血清与非对应噬菌体反应的吸附常数。Legendre 抗血

清按不同比例稀释后分别与 Legendre (10^7 pfu/ml) 及非对应的 8 株噬菌体 (10^7 pfu/ml) 以 9:1 的比例混合, 37 °C 共孵育 5 min 后置于冰上终止反应, 测定其滴度, 以反应混合液中噬菌体失活 90% 以上为有中和作用。以上均设置未接触过噬菌体的家兔血清作为对照, 最终结果代入公式 $K = 2.3 D/t \times \lg (P_0/P)$, 求出 K 值。式中 P_0 为未加抗血清时测定的噬菌体滴度, P 为经 t 分钟后测定的噬菌体滴度, $t = 5$ min, D 是抗血清稀释度。

1.7 Legendre 宿主谱

收集本科室结核菌室日常分离的临床病原菌 32 株, 采用罗氏药敏培养基(珠海贝索公司)鉴定菌种和检测药敏, 单斑法测定 Legendre 的宿主谱(host range), 以耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌标准株 H37Rv 为阳性对照, 37 °C 倒置培养, 每天观察实验结果, 出现噬菌斑者为阳性, 即噬菌体能裂解该菌株。6 周以后还未出现噬菌斑者判为阴性, 即噬菌体不能裂解该菌株^[4]。

1.8 噬菌体对理化因素的抵抗力

1.8.1 Legendre 对紫外线、高热、氯仿、75% 酒精的耐受性

噬菌体悬液 (5.0×10^7 pfu/ml) 置于紫外灯 50 cm 处, 每 2 分钟取 100 μ l 测定噬菌体滴度, 检测 Legendre 对紫外线的抵抗力; 噬菌体悬液 (5.0×10^7 pfu/ml) 分别置于 37、60、80 °C 孵育, 每 15 分钟测定噬菌体滴度, 检测 Legendre 热稳定性; 噬菌体 (5.0×10^7 pfu/ml) 与氯仿 1:1 混合, 振荡混匀后于 37 °C 静置 10 min, 离心吸取上层水相, 测定滴度, 检测 Legendre 对氯仿的耐受性; 噬菌体 (5.0×10^7 pfu/ml) 中加入终浓度 75% 酒精中, 37 °C 作用 10 min, 离心吸取下层水相测定噬菌体滴度, 检测 Legendre 对 75% 酒精的抵抗力。

1.8.2 Legendre 对酸碱度的耐受性 将 Legendre (2.0×10^{10} pfu/ml) 加入不同 pH 的 7H9 液体培养基中, 37 °C 恒温孵育 1 h。测定每管噬菌体滴度, 检测 Legendre 对酸碱度的耐受性。将固体培养基 pH 值调至 5.0 和 7.4, 比较相同滴度的 Legendre 在这 2 种培养基中裂解耻垢分枝杆菌的能力。

2 结果

2.1 Legendre 噬菌斑特点和电镜观察

Legendre 噬菌斑圆形透明, 边界清楚, 直径约 1 mm, 呈现出烈性噬菌体的噬菌斑特征。Legendre 头部呈多面体立体对称, 直径平均 65 nm, 长尾, 尾长平均 215 nm, 尾宽平均 22 nm, 属长尾噬菌体科(图 1)。

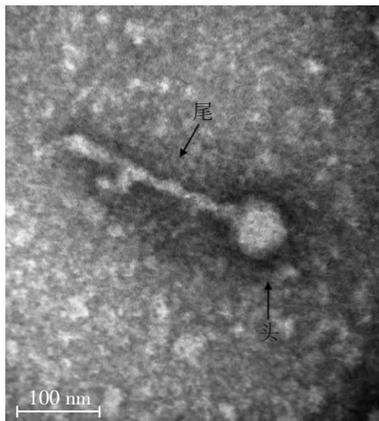
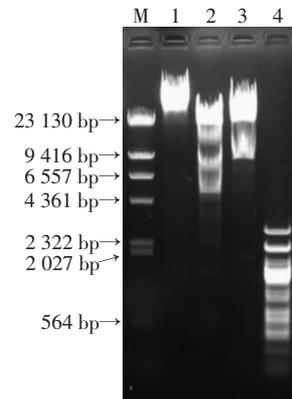


图 1 噬菌体 Legendre 的电镜观察

2.2 Legendre 酶切图谱

Legendre 基因组核酸被限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 和 *Bam*H I 酶切后, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后的结果如图 2 所示。从泳道 2、3、4 可见, Legendre 基因组核酸能够被 *EcoR* I、*Hind* III 和 *Bam*H I 切开, 这 3 种酶能够识别双链 DNA 分子某种特定的核苷酸序列并切割双链 DNA 分子的核酸内切酶, 表明 Legendre 基因组为双链 DNA。酶切图谱分析表明 Legendre 基因组大小为 65 kb 左右。



M: 标准; 1: Legendre 基因组; 2: Legendre DNA/*EcoR* I; 3: Legendre DNA/*Hind* III; 4: Legendre DNA / *Bam*H I

图 2 Legendre 基因组经 *EcoR* I、*Hind* III 和 *Bam*H I 酶切电泳结果

2.3 Legendre 最佳 MOI 和最小 MOI

各板噬菌体滴度结果见表 1。当 $MOI = 10^{-4}$ 时, Legendre 感染耻垢分枝杆菌后产生的子代噬菌体滴度在 8 个感染复数中最高, 即最佳感染复数为 10^{-4} , 后续实验大量扩增 Legendre 时, 可根据最佳感染复数扩增, 以达到最大产量。耻垢分枝杆菌完全被裂解时(即培养板完全透明时), 最高稀释浓度下的噬菌体与细菌数量的比值为 10^{-3} 。

表 1 Legendre 感染复数的测定

管号	细菌数 (cfu)	噬菌体数 (pfu)	感染复数	结果	24 h 滴度 (pfu/ml)
1	3×10^7	3×10^8	10	平板透明	1.2×10^9
2	3×10^7	3×10^7	1	平板透明	2.7×10^9
3	3×10^7	3×10^6	0.1	平板透明	2.5×10^9
4	3×10^7	3×10^5	0.01	平板透明	4.0×10^9
5	3×10^7	3×10^4	0.001	平板透明	1.3×10^9
6	3×10^7	3×10^3	0.000 1	部分噬菌斑融合	9.3×10^{10}
7	3×10^7	3×10^2	0.000 01	310 个噬菌斑	1.1×10^{10}
8	3×10^7	3×10^1	0.000 001	32 个噬菌斑	8.0×10^8

2.4 一步生长曲线

以稀释离心后实际测得上清液中噬菌体数为纵坐标, 感染时间为横坐标, 绘制一步生长曲线(图 3)。0 min 时离心后的沉淀与耻垢分枝杆菌混合后铺板, 产生的噬菌斑数为 18, 即为感染初期感染了噬菌体的宿主菌数。该曲线显示 Legendre 感染宿主菌的潜伏时间约为 180 min, 裂解期为 120 min, 300 min 后进入平台期, 噬菌体滴度不再增加。裂解量: $242/18 \approx 13$, 即 Legendre 感染宿主菌的裂解量为 13。

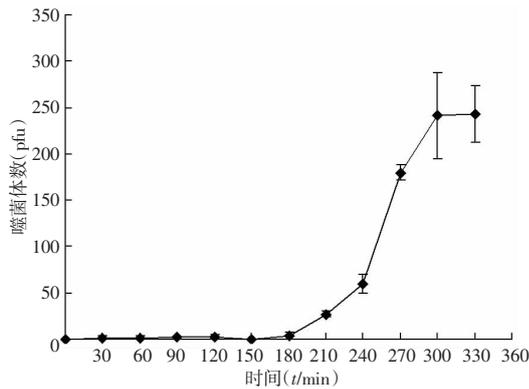


图3 噬菌体 Legendre 一步生长曲线分析

2.5 噬菌体抗血清

Legendre 抗血清稀释 1 250 倍后仍能有效中和 Legendre 对宿主菌的吸附与感染 ($K = 697$), 其抗血清效价为 1/1 250。Legendre 抗血清对非对应噬菌体的中和活性有差异, 对 DNA III、Bo4、Clark、Sedge、Leo 中和活性高, 说明 Legendre 与这几个噬菌体具有共同抗原表位, 对 TM4、D29 中和活性较低。未接触过噬菌体的家兔对照血清也能中和部分噬菌体, 但是达不到抗血清标准 (表 2)。

表 2 9 株噬菌体间的交叉中和试验

噬菌体	Legendre 抗血清				对照血清			
	D	P0	P	K	D	P0	P	K
Legendre	1 250	310	19	697	10	310	10	7
Bo4	500	100	10	230	未稀释	100	10	-
Clark	500	760	76	230	未稀释	760	109	-
DNA III	750	500	43	367	未稀释	500	69	-
33D	100	680	51	52	未稀释	680	678	-
Leo	250	111	1	226	未稀释	111	14	-
Sedge	500	210	16	257	未稀释	210	131	-
D29	3	460	39	1.5	未稀释	460	294	-
TM4	10	650	78	4	未稀释	650	66	-

2.6 宿主谱

32 株临床分离株中有 28 株结核分枝杆菌, 2 株牛结核分枝杆菌, 2 株非结核分枝杆菌。Legendre 能裂解耻垢分枝杆菌、结核菌标准株 H37Rv 和大部分临床分离菌株 (表 3)。Legendre 不仅能裂解所有敏感结核菌 (sensitive tuberculosis), 还能裂解耐药结核菌, 对耐药结核菌 (multi-drug resistant tuberculosis, MDR) 和广泛耐药结核菌 (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR) 裂解率达到 100%; Legendre 还能裂解耐药结核分枝杆菌 (drug-resistant bovine tuberculosis) 和多耐药非结核分枝杆菌 (polydrug-resistant non-tuberculous mycobacteria)。

表 3 Legendre 对临床分离株的宿主谱

临床分离株	n	药敏结果	菌株数	裂解菌株数	裂解率	
结核分枝杆菌	28	敏感菌	5	5	100.0%	
		耐药菌	单耐药菌	5	4	80.0%
			多耐药菌	7	6	85.7%
			耐药菌	7	7	100.0%
			广泛耐药菌	4	4	100.0%
牛结核分枝杆菌	2	耐药菌	1	1	100.0%	
		多耐药菌	1	0	0	
非结核分枝杆菌	2	多耐药菌	2	1	50.0%	

2.7 Legendre 对理化性质的抵抗力

Legendre 对紫外线敏感, 紫外线照射 2 min 后已有 99% 以上的噬菌体被杀灭, 但照射 16 min 后仍有少量噬菌体存活。Legendre 不耐热, 60 °C 放置 15 min 后滴度已降低超过 99%。Legendre 对有机溶剂氯仿、75% 酒精敏感, 接触 10 min 后 99% 以上的噬菌体已被灭活。Legendre 的最适 pH 为 7~8, 当 pH < 5 或者 > 10 时噬菌体存活率明显降低。当培养基 pH = 5 时, Legendre 对耻垢分枝杆菌无裂解活性, 当培养基 pH = 7.4 时, Legendre 能裂解耻垢分枝杆菌。

3 讨论

目前中国结核病疫情严峻, 卫生部公布了全国第五次结核病流行病学抽样调查结果^[9]: 我国结核病年发病人数约为 130 万, 占全球发病的 14.3%, 位居全球第 2 位; 15 岁及以上人群肺结核的患病率为 459/10 万, 其中传染性肺结核患病率为 66/10 万, 耐多药率更高达 6.8%。相较于耐药和耐多药结核带来的严重威胁, 抗结核药物研发严重滞后, 急需研发新型抗结核药物, 提高治愈率, 降低病死率。分枝杆菌噬菌体 (Mycobacteriophage, Phage) 有希望作为新型抗结核药物的开发对象。D29 是最早发现的分枝杆菌噬菌体之一, 由 Froman 等^[10]于 1954 年分离, 经过 60 多年的研究, 是目前研究最详尽的噬菌体, 已有多篇文献报道利用 D29 治疗结核病^[11-13], 均观察到 D29 具有抗结核潜力, 但是 D29 已被国外研究者注册专利^[14], 要进一步研究噬菌体疗法必须寻找新的替代噬菌体。噬菌体 Legendre 于 1967 年由 Mankiewicz 分离自结核患者结核结节^[15], 早期研究侧重于分枝杆菌噬菌体分型, 没有 Legendre 用于治疗结核病的相关研究。本研究全面阐述噬菌体 Legendre 的生物学特性, 探究其抗耐药结核的潜力。

形态学观察发现 Legendre 噬菌斑表现为烈性噬菌体噬菌斑特征, 确认 Legendre 为烈性噬菌体还需进行基因组学研究。本实验提取 Legendre 基因组 DNA, 内切酶酶切分析发现 Legendre 基因组为双链 DNA 分子, 基因组大小为 65 kb 左右, 酶切产物中有大于 20 kb 的 DNA 分子片段, 琼脂糖凝胶电泳对大片段 DNA 的分离效果差, 要准确获得基因组大小需行全基因组测序研究。噬菌体负染电镜观察发现 Legendre 具有 215 nm 的长尾, 属长尾噬菌体科, 而 Piuri 等^[16-17]研究发现具有长尾的噬菌体尾部含有复苏因子样基序, 能裂解结核休眠菌, 而 D29 尾部较短, 不含复苏因子样基序, 不能裂解休眠菌。休眠菌是结核病复发和恶化的重要原因, 抗结核药物疗效差^[18], Legendre 可以作为杀灭休眠菌, 减少结核病复发和缩短治疗时间的新治疗手段。

噬菌体一步生长实验前提是确保每1个宿主菌吸附1个噬菌体,所以本实验选择感染复数为0.1。由于是低复数感染,每条细菌只能被1个噬菌体感染,而未吸附噬菌体的宿主菌经过高倍稀释,可以避免二次吸附和感染,不会影响到后续各时间点噬菌体滴度的测定。有实验选择的MOI为 10^{19} ,这样可以保证每条宿主菌都感染噬菌体,却有可能出现1条宿主菌感染多个噬菌体的情况。Legendre一步生长周期为300 min,而多数快生长菌如铜绿假单胞菌一步生长周期小于120 min^[19]。耻垢分枝杆菌虽为快生长分枝杆菌,但相较于铜绿假单胞菌来说,它增殖的速度非常慢,这可能导致其噬菌体潜伏期和裂解期长。通常认为潜伏期、裂解期短对噬菌体疗法有利,而选择裂解量大或小的噬菌体用于噬菌体疗法,还没有定论。有研究者认为裂解量大,子代噬菌体产量高,下一轮感染循环可以感染更多的宿主菌,达到裂解环境中细菌的目的^[20],但另一些研究者认为裂解量小的噬菌体只需要在宿主菌内少量复制,产生很少的子代噬菌体就可以裂解宿主菌,从单个噬菌体裂解能力来说要强于裂解量大的噬菌体^[21],对于这一争论还需进一步研究明确。

噬菌体感染宿主的首要步骤是吸附于菌细胞,而吸附过程可被其抗血清抑制。K值的高低与噬菌体的抗原性密切相关,K值越高抗原性越强,Legendre的K值为697,比D29(K值为1 069.50)低,说明Legendre抗原性比D29弱,推测其在体内清除速度较D29慢。Legendre抗血清和对照血清对TM4中和能力无区别,说明Legendre与TM4无相同抗原表位,可组成“鸡尾酒制剂”用于治疗结核病。本实验还发现未接触过噬菌体的家兔对照血清(已灭活补体)也能杀灭部分噬菌体,虽然达不到抗血清标准,但多数噬菌体仍被杀灭半数以上。提示在噬菌体疗法中,噬菌体在体内失活会很快,需要进一步研发噬菌体保护剂,以减少机体清除噬菌体。

Legendre宿主谱广,是宽噬噬菌体,能裂解绝大多数耐药结核菌,对耐多药结核菌和广泛耐药结核菌裂解率均达到100%,这使其在治疗耐药结核病上具有良好的临床应用前景。结核分枝杆菌动物实验需在生物安全3级(P3)实验室中进行,本实验受实验条件限制未能观察Legendre在动物体内裂解结核菌的能力。Legendre能裂解耻垢分枝杆菌,是用于抗结核治疗的重要条件,结核菌生长缓慢,如果用结核菌扩增Legendre,不仅耗费大量时间,产量也受到限制,耻垢分枝杆菌为快生长分枝杆菌,24 h内即可得到超过 10^{12} pfu的噬菌体(100 ml)。结核菌专性噬菌体如DS6A,培养结核菌加上扩增噬菌体,则需要1个月以上。采用最佳MOI扩增D29,24 h得到的最高产量比Legendre低

10倍(100 ml),而噬菌体疗法需大量的噬菌体,D29难以大量扩增的缺点,限制了其临床应用。此外,非结核分枝杆菌耐药率高,难治疗,预后差,Legendre能裂解多耐药的非结核分枝杆菌,这为非结核分枝杆菌病的治疗提供了新的思路。

Legendre对紫外线、高热、氯仿、酒精菌均敏感,实验操作中可选用这几种方法对噬菌体污染的试验环境和器具消毒。Legendre对氯仿和酒精敏感,说明Legendre衣壳蛋白含脂质,故浓缩制备高滴度Legendre时不能像其他耐氯仿的噬菌体一样采用氯仿抽提。人体血液的pH为7.35~7.45,Legendre在pH 7.4时,生长状态好,推测Legendre在血液的pH值环境内能很好的侵染宿主菌。结核菌为胞内寄生菌,潜伏在巨噬细胞溶酶体内,导致结核病治疗时间长和结核病复发。溶酶体内pH值为5左右,Legendre在pH=5时不能侵染宿主菌形成噬菌斑,另一个分枝杆菌噬菌体TM4在pH=5时也不能侵染宿主菌形成噬菌斑,说明这两种噬菌体在酸性环境下不能裂解宿主菌。但有研究发现TM4在使用耻垢分枝杆菌作为载体的情况下能减少巨噬细胞内结核菌的数量^[22],故推测Legendre也可以利用耻垢分枝杆菌作为载体,杀灭巨噬细胞内的结核菌。

参考文献:

- [1] O'Flaherty S, Ross R P, Coffey A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(4): 801-819.
- [2] Hatfull G F, Jacobs-Sera D, Lawrence J G, et al. Comparative genomic analysis of 60 Mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size[J]. J Mol Biol, 2010, 397(1): 119-143.
- [3] Mc Nerney R, Traore H. Mycobacteriophage and their application to disease control[J]. J Appl Microbiol, 2005, 99(2): 223-233.
- [4] Rybniker J, Kramme S, Small P L. Host range of 14 mycobacteriophages in Mycobacterium ulcerans and seven other mycobacteria including Mycobacterium tuberculosis—application for identification and susceptibility testing[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 1): 37-42.
- [5] 萨姆布鲁克J. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 136-137.
- [6] Niu Y D, Johnson R P, Xu Y, et al. Host range and lytic capability of four bacteriophages against bovine and clinical human isolates of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157: H7[J]. J Appl Microbiol, 2009, 107(2): 646-656.
- [7] Lu Z, Breidt F Jr, Fleming H P, et al. Isolation and characterization of a Lactobacillus plantarum bacteriophage, phiJL-1, from a cucumber fermentation[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 84(2): 225-235.
- [8] 余茂劲, 司解东. 噬菌体实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 27-33.
- [9] 中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心. 全国第五次结核病流行病学抽样调查结果简介[J]. 中国结核病预防控制, 2011, (3): 14-16.
- [10] Froman S, Will D W, Bogen E. Bacteriophage active against virulent

- Mycobacterium tuberculosis. I. Isolation and activity[J]. Am J Public Health Nations Health, 1954, 44(10): 1326-1333.
- [11] 彭丽, 罗永艾, 陈保文, 等. 噬菌体 D29 对感染敏感株结核分枝杆菌豚鼠的疗效[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(8): 733-736.
- [12] 黄新, 高飞絮, 常胜合, 等. 噬菌体脂质体包被液治疗小鼠耐药药结核的初步研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6): 482-485.
- [13] 李宏鸣, 万学勤, 李伟忠. 噬菌体辅助治疗结核性口腔溃疡的初步观察[J]. 口腔颌面外科杂志, 2009, 19(2): 151-152.
- [14] Pasechnik V A, Roberts A D G, Sharp R J. Treatment of intracellular infection, US: 6660264[P]. 2003-12-09.
- [15] Mohelska H, Wisingerova E. Ultrastructural studies of mycobacterial phages isolated from the material of sarcoid patients[J]. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1977, 21(1): 1-8.
- [16] Piuri M, Hatfull G F. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells[J]. Mol Microbiol, 2006, 62(6): 1569-1585.
- [17] Dusthacker A, Hassan V N, Kumar V. Tape measure protein having MT3 motif facilitates phage entry into stationary phase cells of Mycobacterium tuberculosis[J]. Comput Biol Chem, 2008, 32(5): 367-369.
- [18] 何国钧, 肖和平, 唐神结. 结核分支杆菌休眠菌、L型及治疗[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(10): 585-587.
- [19] 李明, 申晓冬, 周莹冰, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 860-863.
- [20] 牛冬燕. 应用噬菌体控制牛及其饲养环境中大肠杆菌 O157: H7 的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2009.
- [21] 周莹冰, 申晓冬, 李明, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 生物学特性的研究[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(10): 999-1001.
- [22] Broxmeyer L, Sosnowska D, Miltner E, et al. Killing of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens[J]. J Infect Dis, 2002, 186(8): 1155-1160.

(收稿:2011-11-20;修回:2012-01-10)

(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)09-0826-01

职业性汞中毒相关性肾病误诊 1 例

彭 芹¹, 游小刚¹, 刘 洪², 张 憬¹ (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科¹;400021 重庆,重庆市中医院肾内科²)

[关键词] 汞中毒相关性肾病;慢性间质炎;脂质过氧化
[中图分类号] R595.2; R692 [文献标志码] B

1 临床资料

患者,女性,49岁,因“头晕3年,尿检和肾功异常2个月”于2012年1月6日入本科就诊。近3年患者头晕、失眠、记忆力减退、四肢感觉异常,近2个月腰酸、下肢间断水肿、夜尿增多、视力下降,查BP 140/90 mmHg,尿常规蛋白3+,潜血2+,BUN 12.1 mmol/L,Scr 156 μmol/L,当地医院诊断为“慢性肾炎、慢性肾功能衰竭”,治疗2周无效(予尿毒清、肾炎康复片等),行肾活检,病理组织送南京军区福州总院。患者随即转入我院。入院查体:P 80/min, BP 131/66 mmHg,慢性病容,贫血貌,眼睑及双下肢轻度水肿,心肺腹未见异常,肾区无叩击痛。超声:右肾 8.8 cm × 4.0 cm,左肾 8.9 cm × 4.2 cm,实质回声稍增强,示双肾符合慢性肾病改变。胸片示双肺纹理增多、粗乱。ALT 19 U/L, TP 68.9 g/L, ALB 39.7 g/L, GLB 29.2 g/L, BUN 7.93 mmol/L, Scr 182.70 μmol/L, UA 146 μmol/L, Cyst-C 2.41 mg/L, CHO 4.54 mmol/L, TG 1.45 mmol/L。抗 ANA、抗 ds-DNA、抗 SM、ANCA、抗 SS-A、抗 SS-B 均阴性。Hb 99 g/L, RBC 3.22 × 10¹²/L, Hct 30.70%, WBC 6.66 × 10⁹/L, N 69.9%, PLT 121 × 10⁹/L。尿常规:蛋白3+,潜血2+;24 h 尿蛋白定量 2.5 g/L,尿 β2-微球蛋白(β2-MG) 1.0 mg/L。南京军区福州总院病理报告:①大多数(6/11)肾小球呈球性缺血性硬化,残留肾小球轻-中度系膜增生;②重度肾小管萎缩及间质纤维化;③重

度慢性间质炎(IgM 阳性浆细胞为主);④动脉硬化4分。病理诊断:轻-中度系膜增生肾炎伴球性硬化;重度慢性间质炎伴肾小管萎缩。根据患者病理诊断,结合患者为油漆工种特殊职业,高度怀疑有重金属中毒的可能性。嘱患者至重庆市职业病防治院监测血、尿重金属指标,异常指标为:血汞 0.624 3 μmol/L、尿汞 0.04 μmol/L、尿肌酐 4 268 μmol/L,尿汞尿肌酐校正比值 9.37。根据职业性汞中毒诊断标准(GBZ89-2007),该患者符合“慢性汞中毒(中度中毒)”;临床诊断:慢性肾功能衰竭(失代偿期),汞中毒相关性肾病。予驱汞治疗:二巯基丙醇注射液 2~3 mg/kg,肌肉注射,4~6次/d,连续用2 d改为2次/d,10 d后改为1次/d。3周后复查尿常规:蛋白±,潜血1+;24 h 尿蛋白定量 353 g/L;肾功:BUN 4.35 mmol/L,Scr 93.05 μmol/L,证实驱汞治疗有效。

2 讨论

长期暴露于汞作业主要因汞以蒸气形式经呼吸道进入人体,或液态汞通过皮肤吸收,随血液分布于肝、肾、脑等。研究发现,慢性汞中毒以神经系统及肾脏损害为主。而肾脏慢性汞中毒表现在以下两方面:①肾小球慢性汞中毒,临床出现中等量以上蛋白尿、血尿,逐渐出现肾功异常。目前报道有膜性肾病^[1]、局灶节段性肾小球硬化症^[2]、微小病变肾病^[3],而系膜增生肾炎少见报道;②肾小管慢性汞中毒,临床出现中等量以下蛋白尿伴尿-N-乙酰-β-D 葡萄糖苷酶(NAG)、尿 β2-微球蛋白(β2-MG)、尿 α1-微球蛋白(α1-MG)浓度增高。病理表现为慢

(下转 831 页)

[通信作者] 彭 芹,电话:(023)68774621, E-mail:peng1qing@163.com