

文章编号:1000-5404(2013)16-1717-04

论著

利福平对脓肿分枝杆菌 L 型的诱导作用

范贵荣, 杨致邦, 黄 进 (400016 重庆, 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室, 基础医学实验教学中心, 病原生物学与免疫实验室)

[摘要] **目的** 探讨利福平对脓肿分枝杆菌 L 型的诱导作用。**方法** 将脓肿分枝杆菌分别接种于含 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平和无利福平的结核分枝杆菌快速液体培养基中培养。含利福平的培养物经 0.45 μm 孔径滤膜过滤, 滤液接种于无利福平的结核分枝杆菌快速液体培养基内返祖培养。将含利福平和无利福平的培养物及返祖菌进行细胞壁染色和透射电镜观察其细胞壁完整性, 扫描电镜观察其表面微观结构。含利福平的培养物转种 L 型菌琼脂平板培养, 无利福平的培养物和返祖菌转种营养琼脂平板培养, 观察其菌落形态。对诱导前接种菌和返祖菌的 16S rDNA 进行鉴定。**结果** 在含 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平浓度的结核分枝杆菌快速液体培养基中培养的脓肿分枝杆菌的细胞壁缺失, 形态为球形, L 型细菌琼脂平板上菌落呈典型油煎蛋样, 而无利福平的结核分枝杆菌快速液体培养基中培养的脓肿分枝杆菌细胞壁完整, 形态为杆状, 营养琼脂平板上呈圆形菌落。256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平浓度的结核分枝杆菌快速液体培养基中培养的脓肿分枝杆菌经返祖后, 返祖菌细胞壁完整, 形态为杆状, 营养琼脂平板上菌落也呈圆形。16S rDNA 鉴定返祖菌与诱导前接种菌的同源性达 100%, 为同一种细菌, 即脓肿分枝杆菌。**结论** 利福平成功诱导脓肿分枝杆菌 L 型。

[关键词] 脓肿分枝杆菌; L 型细菌; 利福平; 细胞壁

[中图分类号] R372; R378.91; R978.3

[文献标志码] A

Induction of rifampicin to L-Forms of *Mycobacterium abscessi*

Fan Guirong, Yang Zhibang, Huang Jin (Department of Pathogenic Biology, Experimental Teaching Center of Basic Medicine, Laboratory of Pathogenic Biology and Immunology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To determine the induction of rifampicin to L-forms of *Mycobacterium abscessi*. **Methods** *Mycobacterium abscessi* were cultured in liquid culture media for culturing *Mycobacterium tuberculosis* rapidly with 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rifampicin to induce their L-forms or without rifampicin, respectively. The cultures of the above culture media were filtrated with 0.45 μm filter membrane. The filtrate was subcultured in the nutrient agar media for reversion. Their cultures of the culture media with 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rifampicin or without rifampicin, and the reversional bacteria were observed for integrity of their cell walls after cell wall staining by transmission electron microscopy, and the microstructures of their surfaces by scanning electronic microscopy. The cultures of the culture media with 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rifampicin were subcultured in L-form agar media, while those of the liquid culture media without rifampicin and the reversional bacteria were subcultured in the nutrient agar media in order to observe the colonial morphology. The reversional bacteria were identified for its semblances with the initial *Mycobacterium abscessi* by 16S rDNA. **Results** After cell wall staining, transmission electron microscopy displayed the cultures of liquid culture media for culturing *Mycobacterium tuberculosis* rapidly with 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rifampicin showed deficient cell walls. Scanning electronic microscopy observed the cultures were in globular shapes, and those in L-form agar media displayed typical fried eggs like colonies. While those of liquid culture media for culturing *Mycobacterium tuberculosis* rapidly without rifampicin showed complete cell walls, rod shapes and round colonial morphologies in nutrient agar media. The reversional bacteria were also in complete cell walls, rod shapes and round colonial morphologies in nutrient agar media. 16S rDNA of the bacteria indicated that the semblances of the reversional bacteria and the initial bacteria were 100%, and identified

[通信作者] 杨致邦, E-mail: dryangfm365@sina.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1542.002.html>(2013-04-10)

they were the same kind of *Mycobacterium abscessi*. **Conclusion** Rifampicin can successfully induce the L-forms of *Mycobacterium abscessi*.

[**Key words**] *Mycobacterium abscessus*; L-form; rifampicin; cell wall

Corresponding author: Yang Zhibang, E-mail: dryangfm365@sina.com

脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*, *M. abscessus*)为一种快速生长的非结核分枝杆菌,是一种细胞内寄生病原菌,常引起肉芽肿性炎症和干酪样坏死,类似结核分枝杆菌病理表现^[1]。其主要发生于手术、介入治疗、插管、人工透析及心脏体外循环等医源性感染,可引起暴发流行;也可经数年甚至数十年的潜伏期而发病^[2-3]。该菌可侵犯全身许多脏器和组织,其中以肺部最为常见;也可通过血脑屏障,引起中枢神经系统病变,近年来已成为医院内感染的重要病原菌^[4-5]。因其对大多数抗生素、抗结核药物高度耐药,使治疗相当困难,病程迁延不愈^[2,6]。目前对结核分枝杆菌的研究结果显示,结核分枝杆菌L型是结核分枝杆菌抵抗外界环境和赖以生存的重要形式,其染色性、致病性、对药物的敏感性等与原菌有明显差异,许多常规检测方法不能检测出,并可在体内长期存活或继续繁殖,逃避机体免疫功能的攻击,使其对抗结核药物产生耐药,导致结核病恶化进展、迁延不愈和复发^[7]。脓肿分枝杆菌对抗结核药高度耐药和所致疾病病程迁延不愈,是否也与其L型有关,国内外尚少见有关报道。本研究从利福平对脓肿分枝杆菌L型的诱导作用进行探讨,为脓肿分枝杆菌耐药机制的研究和感染防治提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

脓肿分枝杆菌(ATCC19977)为重庆医科大学病原生物学教研室备存。结核分枝杆菌快速液体培养基购自青岛海博生物科技公司,营养琼脂购自北京陆桥技术有限责任公司,单宁酸、结晶紫购自重庆卓诺生物技术有限公司,利福平购自Sigma公司,营养琼脂平板、L型细菌琼脂平板为自己配制。

1.2 方 法

1.2.1 利福平对脓肿分枝杆菌L型的诱导 配制含次MIC浓度的利福平结核分枝杆菌快速液体培养基:利福平在结核分枝杆菌快速液体培养基中对脓肿分枝杆菌的MIC为512 μg/mL^[8]。取20 mg/mL的利福平溶液64 μL加入4.936 mL结核分枝杆菌快速液体培养基中配制成含256 μg/mL利福平的结核分枝杆菌快速液体培养基。

接种脓肿分枝杆菌标准株于结核分枝杆菌快速液体培养基,37℃孵箱培养3 d,培养物用生理盐水稀释成0.5麦氏单位脓肿分枝杆菌菌悬液(约10⁸ CFU/mL)。分别接种100 μL 0.5麦氏单位脓肿分枝杆菌菌悬液于5 mL含256 μg/mL利福平的结核分枝杆菌快速液体培养基作为诱导组和未含利福平

的结核分枝杆菌快速液体培养基作为对照组,37℃孵箱培养7 d备用。

1.2.2 L型细菌琼脂平板及营养琼脂平板培养 L型细菌琼脂平板按文献[9]配制:牛肉浸出液80 mL,氯化钠4.5 g,蛋白胨(多胨)2.0 g,琼脂1.0 g,调整pH至7.6,高压蒸汽灭菌121℃20 min后冷却至55~60℃,加入20%小牛血清,混匀倾注平板备用。

营养琼脂平板按售品营养琼脂说明书配制,高压蒸汽灭菌121℃15 min后冷却至55~60℃,倾注平板备用。

将诱导组的培养物振荡混匀,取100 μL加于L型细菌琼脂平板上,使菌液均匀覆盖整个平板;对照组的培养物振荡混匀,取100 μL加于营养琼脂平板上,37℃孵箱培养7 d,观察菌落形态。

1.2.3 细胞壁染色 将诱导组和对照组的培养物分别涂片,自然干燥,火焰固定,50 g/L单宁酸溶液染色3~5 min,蒸馏水冲洗,0.2%结晶紫溶液染色3~5 min,蒸馏水冲洗,干燥后油镜镜检^[10]。

1.2.4 透射电镜检测 当上述诱导组和对照组培养物的菌浓度D(600)≥0.8时,分别以4 000 r/min、10 min离心,弃去上清液,保留1.5 mL细菌液体。再将细菌团块吹打混匀,将菌液移入1.5 mL EP管中,10 000 r/min、15 min离心,吸净上清液,沿管壁缓慢加入固定液,送重庆医科大学生命科学院电镜室检测。

1.2.5 扫描电镜检测 将上述诱导组和对照组的培养物分别按1:20体积比加入等渗生理盐水,轻轻振荡混匀,800 r/min,离心3~5 min,吸净上清液,再加入上述清洗液,同样操作3~4次。然后经3%戊二醛固定2 h以上,0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次,45 min,1%锇酸固定2 h,依次经50%、70%、80%、90%、95%酒精脱水15 min,叔丁醇15 min,临界点干燥,镀膜,Hitachi 5-3000N型扫描电镜镜检。

1.2.6 返祖鉴定 上述诱导组的培养物经0.45 μm孔径滤膜过滤,滤液接种于5 mL无利福平的结核杆菌快速液体培养基,37℃孵箱培养7 d,培养物进行细胞壁染色和透射电镜观察其细胞壁完整性,扫描电镜观察其表面微观结构,转种营养琼脂平板培养,观察其菌落形态,具体步骤同前。对返祖菌和最初接种的脓肿分枝杆菌的16S rDNA进行鉴定。

2 结 果

2.1 细胞壁染色形态

诱导菌和对照菌分别涂片,经单宁酸法细胞壁染色,细胞壁呈紫色,细胞质呈淡紫色。油镜下诱导菌呈淡紫色(图1A),脓肿分枝杆菌呈深紫色(图1B)。

2.2 透射电镜检测

经透射电镜检查,诱导菌细胞壁部分或完全缺失(图2A),

对照菌细胞壁完整(图2B)。

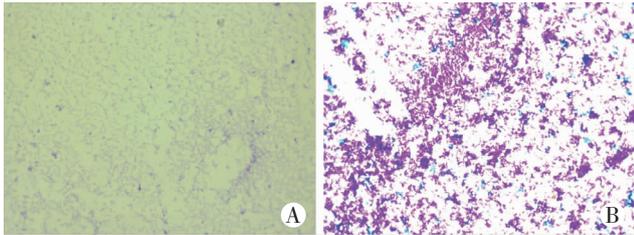


图1 诱导菌(A)和脓肿分枝杆菌(B)的细胞壁染色观察
(单宁酸 ×1 000)

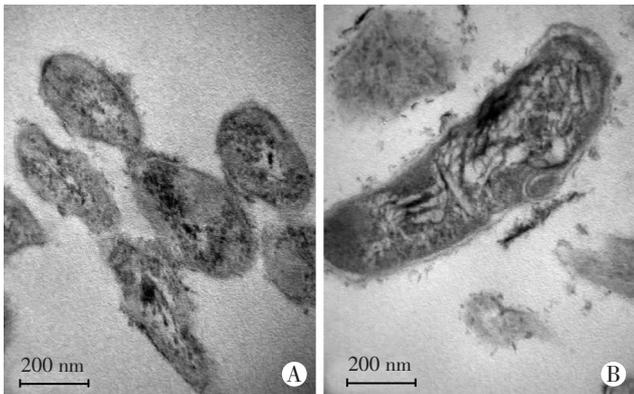


图2 诱导菌(A)和脓肿分枝杆菌(B)透射电镜下形态观察

2.3 扫描电镜检测

经扫描电镜检查,诱导菌呈球形(图3A),对照菌呈杆状(图3B)。

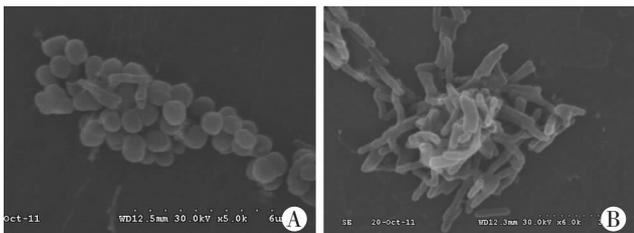
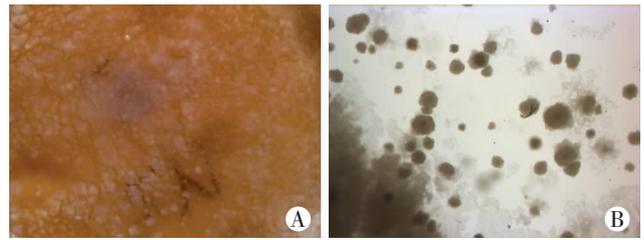


图3 诱导菌(A)和脓肿分枝杆菌(B)扫描电镜下形态观察
(×5 000)

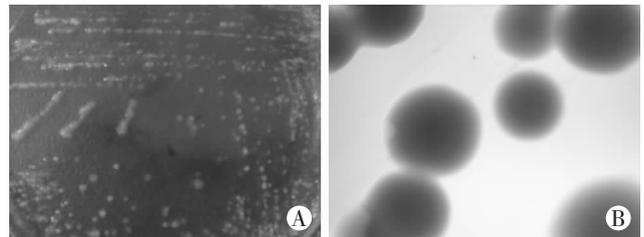
2.4 L型细菌琼脂平板及营养琼脂平板培养

诱导组的培养物在L型细菌琼脂平板可见灰白、细小、云雾样菌落(图4A),低倍镜下呈油煎蛋样(图4B)。对照组的培养物在琼脂平板上可见灰白、细小、光滑湿润、凸起菌落(图5A),低倍镜下呈圆形(图5B)。



A: L型细菌琼脂平板培养菌落; B: 油煎蛋样菌落(×40)

图4 诱导组细菌菌落形态观察

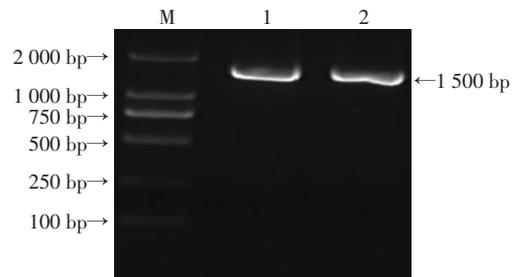


A: 营养琼脂平板培养菌落; B: 低倍镜下菌落(×40)

图5 对照组细菌菌落形态观察

2.5 返祖鉴定

返祖菌经单宁酸法细胞壁染色,油镜下呈深紫色(图6A);经透射电镜检查,细胞壁完整(图6B);经扫描电镜检查,细菌形态呈杆状(图6C);营养琼脂平板上可见灰白、细小、光滑湿润、凸起菌落(图6D),低倍镜下呈圆形菌落(图6E),与对照组菌落相同。16S rDNA 鉴定,琼脂糖凝胶电泳(图7)可见1 500 bp左右的DNA,经测序其序列与诱导前接种菌进行比对分析,同源性达100%,表明返祖菌与诱导前接种菌为同一种细菌,即脓肿分枝杆菌。



M: DNA 标准(DL 2000); 1: 最初脓肿分枝杆菌 16S rDNA; 2: 返祖菌 16S rDNA

图7 返祖菌和最初脓肿分枝杆菌的16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳结果



A: 细胞壁染色观察(单宁酸×1 000); B: 透射电镜下形态观察(×100 000); C: 扫描电镜下形态观察(×5 000); D: 营养琼脂平板培养菌落; E: 低倍镜下菌落(×40)

图6 返祖菌形态观察

3 讨论

分枝杆菌在物理、化学以及免疫等因素作用下,可发生细胞壁部分或完全缺损,形成细胞壁缺陷型,即L型。本实验采用利福平诱导脓肿分枝杆菌L型的形成。利福平对结核分枝杆菌L型和脓肿分枝杆菌L型的诱导浓度相差悬殊。0.1 μg/mL利福平对结核分枝杆菌L型的诱导作用最强,形成L型的数量最多^[11],而此浓度对于脓肿分枝杆菌L型的诱导作用较弱,未见或仅见少量L型的形成。低于256 μg/mL的利福平只能诱导脓肿分枝杆菌部分发生细胞壁的缺损,512 μg/mL及以上浓度的利福平能够杀灭脓肿分枝杆菌,256 μg/mL的利福平既不能杀灭脓肿分枝杆菌,又能诱导其完全发生细胞壁的缺损,形态由杆状变为球状,在L型琼脂培养基上呈典型油煎蛋样菌落。脓肿分枝杆菌L型在256 μg/mL利福平的结核分枝杆菌快速液体培养基生长缓慢,37℃孵箱培养第2天可见脓肿分枝杆菌L型的形成但未见或仅见少量细菌型生长,每高倍镜视野2~5个L型细胞,继续培养至7d后,可见脓肿分枝杆菌L型逐渐增多但未见细菌型生长。本实验的对照除了不加入利福平外,其他的培养条件与诱导菌完全一样,消除了培养条件差异带来的影响;返祖培养采用利福平诱导的培养物经0.45 μm孔径滤膜过滤,滤液接种于5 mL无利福平的结核杆菌快速液体培养基内进行返祖培养,因为细菌型脓肿分枝杆菌不能滤过0.45 μm孔径滤膜,所以消除了细菌型脓肿分枝杆菌的影响。返祖菌细胞壁完整,细菌形态由球状变为杆状,在营养琼脂平板上呈圆形菌落,所有菌落形态相似。返祖菌经16S rDNA鉴定,琼脂糖凝胶电泳可见1 500 bp左右的DNA,经测序其序列与诱导前接种菌进行比对分析,同源性达100%,表明返祖菌与诱导前接种菌为同一种细菌,即脓肿分枝杆菌。说明利福平能诱导脓肿分枝杆菌L型的形成。

细菌L型由于细胞壁的缺陷而引起许多酶和毒素发生改变,其抗原性、致病性及对药物的敏感性等与原菌不完全相同^[12-13]。脓肿分枝杆菌L型的成功诱导可用于进一步研究脓肿分枝杆菌L型的抗原性、致

病性及对药物的敏感性的变化情况,进一步探讨脓肿分枝杆菌感染的恶化及复发、天然或获得多药耐药和透过血脑屏障和胎盘屏障的机制等,为脓肿分枝杆菌的防治提供实验依据。

参考文献:

- [1] Talati N J, Roupael N, Kuppalli K, et al. Spectrum of CNS disease caused by rapidly growing mycobacteria[J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8(6): 390-398.
- [2] Furuya E Y, Paez A, Srinivasan A, et al. Outbreak of *Mycobacterium abscessus* wound infections among 'lipotourists' from the United States who underwent abdominoplasty in the Dominican Republic[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(8): 1181-1188.
- [3] 李艳冰, 张媛媛, 黄明翔, 等. hsp65 and rpoB PCR-RFLP用于脓肿分枝杆菌复合群种的快速鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(7): 645-652.
- [4] Medjahed H, Gaillard J L, Reyrat J M. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field[J]. Trends Microbiol, 2010, 18(3): 117-123.
- [5] Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* [J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5660.
- [6] Hoffling-Lima A L, de-Freitas D, Sampaio J L, et al. In vitro activity of fluoroquinolones against *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae* causing infectious keratitis after LASIK in Brazil[J]. Cornea, 2005, 24(6): 730-734.
- [7] 于守平, 钱爱东, 单晓枫, 等. 结核分枝杆菌L型研究现状与兽医临床[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(3): 263-265.
- [8] 张任飞, 杨致邦. 脓肿分枝杆菌的耐药分子机制研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(z1): 106-108.
- [9] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 869-870.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 358-359.
- [11] 王和, 梁菁苹, 徐艳, 等. 结核菌L型的形成及其分离与鉴定[J]. 贵州医药, 2005, 29(12): 1059-1062.
- [12] 林特夫, 黄谷良. 细菌L型感染的意义和研究进展(四)——细菌L型的检验和鉴定[J]. 蚌埠医学院学报, 2008, 33(2): 127-131.
- [13] Markova N, Slavchev G, Michailova L. Unique biological properties of *Mycobacterium tuberculosis* L-form variants: impact for survival under stress[J]. Int Microbiol, 2012, 15(2): 61-68.

(收稿:2012-12-26;修回:2013-03-24)

(编辑 邓强庭)