

测费用较高,在现场使用有一定的局限性。扩增片段长度多态性快速检测技术是病原核酸检测技术上的长足进步,现已建立起来的 AFLP-PCR 具有高效、快速、简便的优越性,为及时快速检测提供了新方法。

本研究选择了肺炎链球菌的特异基因作为靶序列,设计了两对引物,对基因组 DNA 进行双酶切后链接,优化反应条件,选择适宜的反应液配方,建立了 AFLP 方法检测肺炎链球菌。该方法灵敏度高,最低可检测到 1.5×10^3 CFU/ml,与其他 PCR 快速诊断检测水平相当^[7,8];特异度高,未出现假阴性和假阳性,本研究所用 20 株肺炎链球菌均能检测出来,而 15 株非肺炎链球菌,包括金黄色葡萄球菌、草绿色链球菌等革兰阳性菌,也包括大肠杆菌、铜绿假单胞菌等革兰阴性菌,均未检测出来,表明特异度高,并且电泳图形具有一定的可识别性。

为了及时准确地检测出疑似病例是否为肺炎链球菌感染,需要有灵敏特异的检测方法。提取细菌 DNA 进行肺炎链球菌病原学的鉴定,尤其是与菌落形态与其相似的草绿色链球菌鉴别,是人们一直在寻找的方法。AFLP 简单、快速、敏感性好、特异性高,本研究 AFLP 条带较多,特征性强,分辨率较高,能可靠地检测出肺炎链球菌的同时,还可以分析出亲缘关

系,适合肺炎链球菌的早期诊断,尤其是无菌体液中的侵袭性感染,有着较大的诊断意义。

参考文献

- 1 綦廷娜,王和,陈峥宏.肺炎链球菌 L 型对人淋巴细胞因子分泌刺激作用[J]. 中国公共卫生,2010,26(5):610-611
- 2 Barzilay EJ, Brien KL, Kwok YS, *et al.* Could a single dose of pneumococcal conjugate vaccine in children be effective? Modeling the optimal age of vaccination[J]. Vaccine, 2006, 24(7):904-913
- 3 胡晓彦,桂炳东,王伶,等. BOX-PCR 技术在肺炎链球菌的检测中的应用[J]. 实验与检验医学,2010,28(3):209-211
- 4 樊慧珍,于化鹏,黄文杰,等. DNA 探针杂交快速检测肺炎链球菌和流感嗜血杆菌[J]. 第一军医大学学报,2005,12(10):1503-1505
- 5 Kalpoe JS, Templeton KE, Horrevorts AM, *et al.* Molecular typing of a suspected cluster of nocardia farcinica Infections by use of randomly amplified polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis, and amplified fragment length polymorphism analyses[J]. Journal of clinical microbiology, 2007, 45(12):4048-4050
- 6 张顺,蔡挺,陈琳,等. 用 AFLP 分型和分子标记研究鲍曼不动杆菌院内感染传播途径[J]. 现代实用医学,2009,21(1):7-9
- 7 Dijkshoorn L. Typing acinetobacter strains: applications and methods[J]. Acinetobacter Biology and Pathogenesis, 2009, 1(20):85-88
- 8 胡农,蔡挺,张顺,等. 耐药鲍曼不动杆菌扩增片段长度多态性分析指纹图谱数据库的建立[J]. 浙江大学学报:医学版, 2007, 36(6):537-542 (收稿:2011-06-09) (修回:2011-06-23)

两组鲍曼不动杆菌对 Hep-2 细胞黏附及致其凋亡情况的研究

刘彩霞 乔增培 杨锦红 李向阳

摘 要 **目的** 研究全敏感与泛耐药两组鲍曼不动杆菌对 Hep-2 细胞黏附及致其凋亡情况的差异。**方法** 选取 20 株全敏感和 20 株泛耐药鲍曼不动杆菌,调菌浓度为 3×10^8 CFU/ml,取 0.5ml 分别加入到 Hep-2 细胞株的单细胞层培养物中,放 5% CO₂ 培养箱分别培养 2、8、12、16 和 20h,分别用于计算 Hep-2 细胞的细胞黏附率和细胞黏附指数,不同时间段细胞凋亡情况的分析。**结果** 全敏感菌株对 Hep-2 细胞的黏附以分散广泛黏附为主,引起细胞株病变快且形态改变明显;泛耐药菌株对 Hep-2 细胞的黏附以局部黏附为主,易被细胞吞噬,致细胞株病变慢,诱导细胞凋亡时间较全敏感菌株滞后。两组耐药性不同的菌株在对 Hep-2 细胞的平均细胞黏附率上存在显著性差异,但在平均细胞黏附指数上的差异无统计学意义。**结论** 泛耐药鲍曼不动杆菌对 Hep-2 细胞表现出黏附能力和致细胞病变能力的减弱,或许是自身突变、外膜蛋白缺失及各种耐药基因插入的影响,但具体原因和机制有待进一步研究。

关键词 鲍曼不动杆菌 黏附 凋亡

基金项目:温州市科技局资助项目(Y20110095)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院检验科

Adherence and Induced Apoptosis to Hep-2 Cell in Two Different Groups of *Acinetobacter Baumannii* Strains. Liu Caixia, Qiao Zengpei, Yang Jinhong, Li Xiangyang. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To study on the adherence and apoptosis to Hep-2 cells in two different groups of *acinetobacter baumannii* strains. **Methods** Totally 20 susceptible and pandrug-resistant strains were selected and 0.5ml of the bacter suspension with a concentration of 3×10^8 CFU/ml was added into the monolayer cultures of Hep-2 cells. Then the culture was kept in the temperature of 37℃ and the atmospheric concentraion of 5% CO₂ for 2, 8, 12, 16 and 20h respectively. Finally, the adherence rate, adherence index and apoptosis situation of Hep-2 cells from different time were calculated. **Results** The group of susceptible strains adhering to the Hep-2 cells was mainly in disperse and wide pattern, which caused quick cell lesion and obvious morphological change; while pandrug-resistant strains were mainly local adherence, which caused light cell lesion and slow morphological change. There was significant difference in the average rate of cell adherence, while no significant difference in the average cell adhesion index between the two groups was found. **Conclusion** It illustrated that the ability of adhering to Hep-2 cell and cytopathogenicity were weakened in pandrug-resistant strains. Even though the mechanism of adherence and pathogenicity of *A. baumannii* still remains to be elucidated, it was assumed that self mutation, the deficiency of outer membrane protein or the effect of inserting of various drug-resistance genes might cause the above results.

Key words *Acinetobacter baumannii*; Adherence; Apoptosis

鲍曼不动杆菌(*acinetobacter baumannii*, AB)作为条件致病菌,广泛分布于自然界。近年来,因其在医院内感染中的分离率和泛耐药菌株的迅速增多而引起广泛关注。2007年Smith等^[1]通过直接测序,运用比较基因组学的方法发现,AB基因组中含有许多外来基因岛,除了一些插入元件和耐药基因外,还包括一些毒力基因;他们还通过插入突变的方法获得了一株无毒力的鲍曼不动杆菌。那么各种耐药基因盒的随机插入,是否引起临床上不同耐药表型AB致病力的改变呢?本实验拟通过对全敏感和泛耐药两组AB对Hep-2细胞的黏附及致其病变情况的观察,分析两组AB之间黏附定植及诱导细胞凋亡能力上的差异。

对象与方法

1. 菌株基本情况:(1)鉴定与药敏:40株AB均采用Walk-Away 96SI全自动微生物鉴定/药敏系统进行鉴定及药敏。所测抗菌药物包括:头孢噻肟、头孢他啶、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林、替卡西林/克拉维酸、头孢吡肟、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星、亚胺培南、复方新诺明、妥布霉素、左旋氧氟沙星、头孢曲松、氨曲南和头孢哌酮/舒巴坦。(2)菌株分布:20株泛耐药菌株均分离自成人ICU患者的痰液标本,20株全敏感菌株分离自新生儿、儿童留观室、儿童感染科和儿童呼吸科患者的痰液标本。泛耐药菌株为对上述17种药物均耐药,全敏感菌株则对上述17种药物均敏感。

2. 细胞培养及相关试剂:Hep-2细胞株购自上海细胞库,RPMI1640培养基按GIBCO的说明书配制,小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,0.25%的胰酶、细胞培养瓶和培养板均购自吉泰生物医药技术有限公司,凋亡DNA Ladder提取试剂盒购自上海超研生物科技有限公司。

3. 方法:(1)菌株的培养:各菌株分别接种于LB肉汤,37℃过夜的培养,然后用PBS调菌液浓度为 3×10^8 CFU/ml备用。(2)菌株对Hep-2细胞的黏附功能测定:将 2.5×10^5

个/毫升的Hep-2细胞悬液接种于内置盖玻片的含RPMI 1640培养液3ml的6孔培养板中,过夜培养后,用事先预热的PBS冲洗3次,分别加入菌悬液0.5ml,37℃,5% CO₂环境中培养2h,取出盖玻片,PBS漂洗3次,自然干燥,甲醇固定15 min,革兰染色,油镜下观察菌株对细胞的黏附情况并随机计数至少100个细胞,计算两组AB的平均细胞黏附率和黏附指数。细胞黏附率=被细菌黏附的细胞数/视野内总细胞数×100%,细胞黏附指数=黏附细菌数/视野内总细胞数×100%。(3)受染后细胞形态学及凋亡现象的检测:将Hep-2细胞分别接种于含和不含盖玻片的6孔培养板中,每孔加3ml培养液,待细胞基本铺满培养孔后,用事先预热的PBS洗2次,再加入3ml培养液;取0.5ml菌悬液分别加入到含和不含盖玻片的6孔培养板中,每株菌各加8个孔,放37℃5% CO₂培养箱孵育,分别在8、12、16、20h观察细胞变化并收集细胞。取出盖玻片进行瑞氏染色,观察凋亡小体。收集的细胞按细胞凋亡-DNA Ladder抽提试剂盒说明书操作提取DNA,然后进行电泳。

4. 统计学方法:数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,比较分析用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 鲍曼不动杆菌对Hep-2细胞的黏附:①黏附形式:全敏感菌株对细胞的黏附多以周围分散广泛黏附为主;泛耐药菌株以在细胞的某一区域局部黏附为主,且更易被细胞吞噬。如下图1所示;②平均细胞黏附率和黏附指数:两组AB的细胞黏附率和黏附指数如表1所示。

2. 细胞形态学变化:全敏感菌株组引起细胞形态改变明显,16h时Hep-2细胞已基本变圆浮起,20h时几乎无贴壁细胞。泛耐药菌株组引起细胞形态改变相对较缓慢,20h时仍有一些贴壁细胞。具体变化如图2所示。

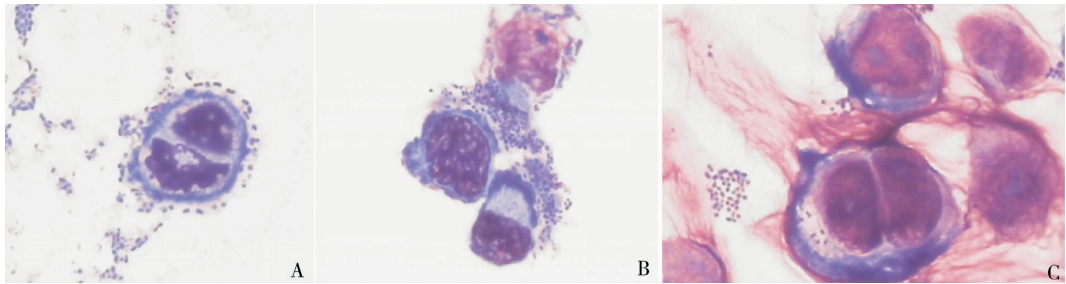


图 1 不同 AB 菌株黏附于 Hep-2 细胞的形式

A. AB 在细胞周围的广泛黏附;B. AB 在细胞的局部黏附;C. 部分细菌被吞入细胞的胞质内

表 1 两组 AB 对 Hep-2 细胞的黏附情况 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	平均细胞黏附率	平均细胞黏附指数
全敏感组	57.05 ± 4.93 *	105.2 ± 9.53 *
泛耐药组	40.20 ± 4.56 *	111.1 ± 9.26 *

两组之间比较, * $P < 0.05$

3. 凋亡细胞的观察:感染后各菌株各时间段标本经瑞氏染色,油镜下观察,以 16h 细胞变化最大,破碎的细胞多见。典型的凋亡细胞较少见。各种细胞形态如图 3 所示。

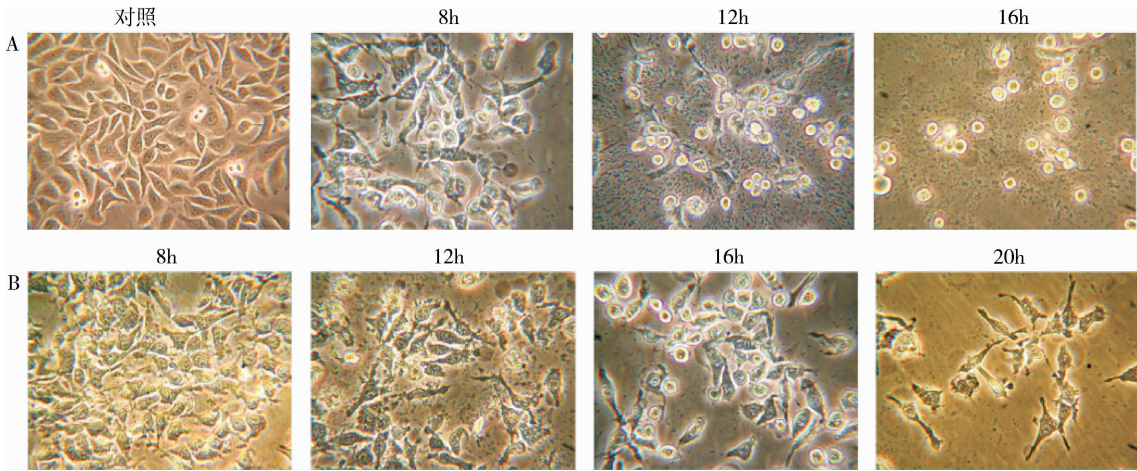


图 2 不同菌株不同时间点引起 Hep-2 细胞的形态变化

A. 一株分离自新生儿的全敏感菌株引起的 Hep-2 细胞形态学变化;B. 一株分离自成人 ICU 的泛耐药菌株引起的 Hep-2 细胞形态学变化

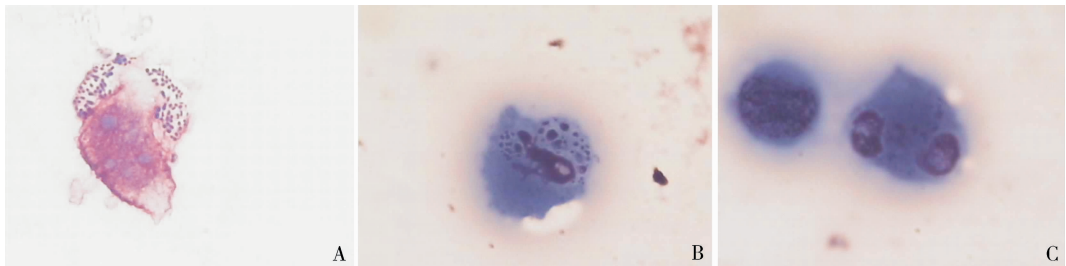


图 3 实验中具有代表性的细胞形态图

A. 破碎的 Hep-2 细胞;B. 含凋亡小体的 Hep-2 细胞;C. 细胞核固缩的凋亡 Hep-2 细胞

4. 细胞凋亡的琼脂糖电泳检测:两组鲍曼不动杆菌均可诱导 Hep-2 细胞发生凋亡,但时间上略有差异。全敏感组致细胞凋亡高峰多出现在 12 ~ 16h;泛耐药组致细胞凋亡高峰多出现 16 ~ 20h。部分菌株凋亡电泳图如图 4 所示。

讨 论

鲍曼不动杆菌对干燥及普通的消毒剂具有极强的耐受性,对由该菌引起的院内感染病人,在其出院 9 天后,其床边物表仍可分离到同一克隆菌株^[2]。众多的研究表明,无论是省内、国内还是国际上都存在

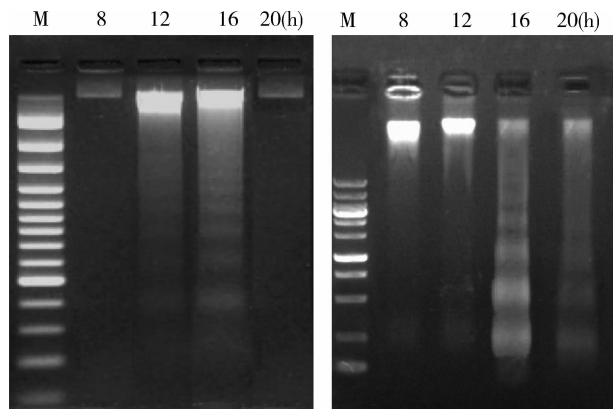


图4 两组细菌在不同时间点致 Hep-2 细胞
凋亡的典型凋亡电泳图

A. 一株全敏感菌株致 Hep-2 细胞的凋亡电泳图; B. 一株泛耐药菌株致 Hep-2 细胞的凋亡电泳图

几个多重耐药克隆株引起医院感染的报道^[3-5]。多重耐药克隆菌株较敏感克隆菌株更易播散,但两者的致病能力有何差异,目前的研究尚未揭示答案。

鲍曼不动杆菌不分泌毒素和侵袭性酶类,其毒力因子和致病机制也是目前的研究热点。Nural 等^[6]报道称鲍曼不动杆菌对上皮细胞的黏附存在甘露糖抵抗现象,这种甘露糖抵抗的黏附现象是由 P 型菌毛介导的,具有受体特异性。本实验结果显示,全敏感菌株对 Hep-2 细胞的黏附方式以分散广泛黏附为主,而泛耐药菌株的黏附以大量细菌局部黏附为主,由此推测全敏感菌株表面黏附素的表达较泛耐药菌株充分,导致黏附方式存在差异,这可能与细胞的吞噬杀伤相关,同时大量的细菌局部聚集还可能形成了生物被膜或其他的原因造成免疫逃逸,短时间内导致细菌与细胞共存。目前对于鲍曼不动杆菌毒力因子的研究中,以外膜蛋白(outer membrane proteins, OMP)的研究较为深入。OMP 不仅在细菌的耐药中起重要作用,而且在细菌侵入和诱导宿主细胞病变中也扮演重要角色。Choi 等^[7,8]认为 OmpA 直接介导了鲍曼不动杆菌对上皮细胞的侵入;在鲍曼不动杆菌感染宿主细胞后 Omp38 定位于宿主细胞线粒体和细胞核,并释放促凋亡因子如细胞色素 C 和 AIF,后者介导 caspase 依赖和 AIF 依赖的凋亡机制,促使上皮细胞凋亡。Mussi 等的研究表明,当 carO 基因前有插入序列时,会发生插入失活导致 carO 基因不表达。说明外来的插入序列可能导致菌株 OMP 基因的失活。国内王辉等^[4]通过亚胺培南体外突变筛选研究

发现,菌株的 OMP 图谱发生很大的改变,存在一些 OMP 的缺失和表达量降低。本实验中泛耐药组细菌致细胞病变缓慢而不明显,诱导 Hep-2 细胞凋亡时间较全敏感组菌株滞后,可能与泛耐药组菌株存在 OMP 缺失和表达量降低有关,同时也说明鲍曼不动杆菌还存在其他的诱导细胞凋亡的毒力因子。

综上所述,本实验从宏观上证明药敏情况完全不同的两组细菌对细胞的黏附和致病变能力存在较大差异。说明泛耐药菌株在各种抗菌药物的压力下可能处于一种营养不良状态,一方面毒力因子的弱表达,致病变能力减弱的同时导致了免疫逃逸,另一方面耐药基因的获得和自身突变,增强了对抗菌药物的耐受。这可能是多重耐药克隆株易于流行的部分原因。同时我们还需警惕强毒力株的产生,各种可移动元件的随机插入可能导入外源毒力基因,也可能活化菌株自身毒力基因的高表达,从而诱导出强毒力株,所以需要临床工作中的长期关注。

参考文献

- Smith GM, Gianoulis TA, Pukatzki S, et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis[J]. Genes Dev, 2007, 21(5): 601-614
- Richet HM. Nosocomial gram negative bacilli: they are back! Dealing with *Acinetobacter*, 44th Interscience conference on Antimicrobial Agents and chemotherapy, October 30 ~ November 2, 2004, Washington DC
- 裘莉佩, 潘登, 徐炜烽, 等. 鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型及分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(4): 381-384
- 王辉, 郭萍, 孙宏莉, 等. 碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌分子流行病学及其泛耐药的分子机制[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(12): 1066-1073
- Federico P, Andrea MH, Kristine MH, et al. Global challenge of multidrug-resistant *acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2007, 51(10): 3471-3484
- Nural C, Melek D, Ilknur K, et al. Evaluation of biofilm production gelatinase activity and mannose-resistant hemagglutination in *acinetobacter baumannii* strains [J]. J Microbiol Immunol Infect. 2008, 41(10): 513-518
- Choi CH, Lee JS, Lee YC, et al. *acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells [J]. BMC Microbiol, 2008, 8(10): 216-227
- Choi CH, Lee EY, Lee YC, et al. Outer membrane protein 38 of *acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells [J]. Cell Microbiol, 2005, 7(8): 1127-1138

(收稿: 2011-09-27)

(修回: 2011-10-19)