

RCCS 模拟微重力对铜绿假单胞菌莫西沙星敏感度的影响

黄玉玲 易 勇 杨建武 江文俊 贾莉萍 杨鹤鸣 周金莲 崔 彦 徐冰心

摘 要 **目的** 研究三维细胞培养系统(RCCS)模拟微重力对铜绿假单胞菌莫西沙星敏感度的影响。**方法** 采用 RCCS 建立铜绿假单胞菌 ATCC 27853 模拟微重力环境培养体系,实验组旋转瓶轴心与地面平行模拟微重力环境,对照组即重力组旋转瓶轴心与地面垂直,分别于培养第 1、7、14 天取实验组与对照组菌悬液,采用肉汤稀释法检测莫西沙星作用的最低抑菌浓度(MIC)。K-B 法检测莫西沙星抑菌环直径,采用荧光染色剂 SYTO-9 和碘化丙啶(PI)进行染色,检测不同浓度(0.125 ~ 64.000 $\mu\text{g/ml}$)莫西沙星作用下实验组与对照组的活菌比例。**结果** 肉汤稀释法检测各时相点实验组与对照组铜绿假单胞菌莫西沙星 MIC 均为 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。K-B 法检测发现,与对照组相比,实验组各时相点莫西沙星抑菌环直径明显延长($P < 0.05$),且随模拟微重力时相延长,实验组抑菌环直径呈不断延长趋势($P < 0.05$)。实验组各药物浓度下活菌比例均小于对照组,且随模拟微重力时相延长,同一药物浓度下,实验组活菌比例逐渐减少($P < 0.05$)。**结论** 14 天 RCCS 模拟微重力能增加铜绿假单胞菌对莫西沙星的敏感度。

关键词 模拟微重力 铜绿假单胞菌 莫西沙星 药物敏感度

[中图分类号] R [文献标识码] A

Effects of Simulated Microgravity with RCCS on the Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to Moxifloxacin. Huang Yuling, Yi Yong, Yang Jianwu, et al. The 306 Teaching Hospital of Peking University Health Science Center, Beijing 100101, China

Abstract Objective To evaluate the effects of simulated microgravity with the rotary cell culture system (RCCS) on the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to moxifloxacin. **Methods** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were grown under simulated microgravity using RCCS oriented to achieve either normal earth gravity (control group) or simulated microgravity (experiment group). After being cultured for 1 day, 7 day and 14 day, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of experiment group and control group were determined by broth dilution method. The diameter of inhibition zones was measured by Kirby-Bauer. SYTO-9 and propidium iodide (PI) taken as fluorochrome, the proportion of live bacteria of *Pseudomonas aeruginosa* in different drug concentrations (0.125 - 64.000 $\mu\text{g/ml}$) were detected by FCM. **Results** MICs were 0.25 $\mu\text{g/ml}$ in each phase of experiment group and control group. Compared with the control group, the diameters of inhibition zones of *Pseudomonas aeruginosa* cultured in modeled microgravity were significantly longer at each phase ($P < 0.05$). The flow cytometry susceptibility test showed that proportions of live bacteria were lower than these of the control group in each drug concentration, and along with extension of simulated microgravity, the live bacteria proportions were continuously decreased in experimental group ($P < 0.05$). **Conclusion** The study showed that the fourteen days' simulated microgravity could increase the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to moxifloxacin, but, had no apparent effect on MIC value.

Key words Simulated microgravity; *Pseudomonas aeruginosa*; Moxifloxacin; Antimicrobial susceptibility

随着航天事业的迅猛发展,太空感染问题亟待深入研究。随宇航员和太空飞行器进入太空的微生物,在失重环境下其生物学性状发生变化,时刻威胁着宇

航员的健康及飞行器的安全^[1,2]。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种常见的条件性致病菌,阿波罗 13 号宇宙飞船执行任务过程中,曾有宇航员发生铜绿假单胞菌引起的泌尿系统感染^[3]。Crabbé 等^[4,5]通过模拟微重力和飞船搭载菌株研究发现,铜绿假单胞菌藻酸盐、弹性蛋白酶、鼠李糖脂产生增加,其中铜绿假单胞菌 POA1 菌株有 330 种基因表达水平高于对照组 1.5 倍以上,涉及多种应激反应蛋白的合成、致病因子的表达、各种生理代谢的物质

基金项目:全军医学科研“十二五”重点项目(BWS11J051)

作者单位:100101 北京大学解放军 306 医院教学医院(黄玉玲、崔彦);100101 北京,解放军第 306 医院(易勇、杨建武、江文俊、贾莉萍、杨鹤鸣、周金莲、崔彦、徐冰心)

通讯作者:崔彦,电子信箱:dryancui@aliyun.com;徐冰心,电子信箱:xubingxin75@163.com

合成等。目前尚无微重力环境下铜绿假单胞菌药物敏感度方面的研究报道。本研究采用三维细胞培养系统 (rotary cell culture system, RCCS) 研究模拟微重力环境对铜绿假单胞菌莫西沙星敏感度的影响,旨在为航天员的医监医保提供参考依据。

材料与方法

1. 主要试剂和仪器:铜绿假单胞菌 ATCC 27853 (中国普通微生物菌种保藏管理中心), LB 培养基和 MH 肉汤培养基 (北京奥博星生物技术有限责任公司), 盐酸莫西沙星注射液 (拜耳医药保健有限公司), 莫西沙星药敏纸片 (北京天坛药物生物技术开发公司), SYTO-9 (美国 Sigma 公司), PI (美国 Sigma 公司), 全温震荡培养箱 (太仓市实验设备厂), RCCS (美国 Synthecon 公司), 恒温恒湿培养箱 (黄石市恒丰医疗器械有限公司), 浊度计 (法国生物梅里埃公司), FACS Calibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2. 实验分组和模拟微重力细菌培养:参照文献[3~5], 将铜绿假单胞菌 ATCC 27853 划线接种于血平板上, 37℃ 过夜培养;取单一菌落,接种于新鲜 LB 液体培养基中, 220r/min 过夜培养。取 50μl 过夜菌悬液接种于 5ml 新鲜 LB 培养基中, 振荡培养至对数生长期, 新鲜 LB 培养基调整菌液浓度为 10^3 。新鲜 LB 培养基浸洗细胞培养瓶 10min, 弃废液;菌液加注到 50ml 培养瓶中, 排空气泡。将培养瓶安置于 RCCS 上, 实验组 (模拟微重力组) 培养瓶轴心与地面平行, 对照组 (地面重力组) 培养瓶轴心与地面垂直, 详见图 1。于 25r/min, 37℃ 下持续培养;每 24h 更换培养基, 过程中注意严格无菌操作, 分别于培养第 1、7、14 天取实验组和对照组适量菌液, 检测莫西沙星药物敏感度。

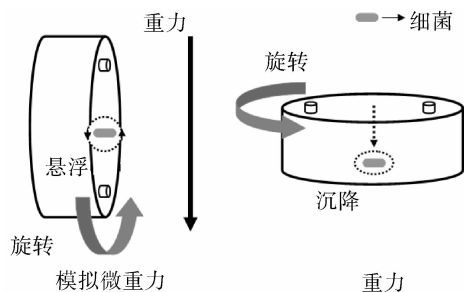


图 1 RCCS 模拟微重力环境及重力环境的实现

3. 肉汤稀释法检测最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC):用试管二倍稀释法测定莫西沙星对实验组和对照组铜绿假单胞菌 ATCC 27853 的 MIC, 操作规范参照 CLSI (M100-S22, 2012) 标准^[6]。

4. K-B 纸片法检测抑菌环直径:0.5 麦氏单位菌悬液用无菌棉拭均匀涂布于 M-H 培养基, 贴莫西沙星药敏纸片后置 37℃ 孵箱培养 24h, 精确量取抑菌环直径。

5. 流式细胞仪检测活菌比例:(1)门设定:取 1ml 菌液, M-H 肉汤稀释成浓度为 0.5 麦氏单位的菌液 (菌液浓度为 1.5×10^8 CFU/ml), 再用 MH 肉汤稀释 20 倍, 菌液终浓度为 7.5

$\times 10^6$ CFU/ml;取 2ml 菌液 4℃ 离心 4000r/min $\times$ 2min, 加入等体积 70% 乙醇, 重悬菌体;处理 10min, 4℃ 离心 4000r/min $\times$ 2min, 收集死菌, 等体积 PBS 重悬;取 2ml 菌液, 4℃ 离心 4000r/min $\times$ 2min, 收集活菌, 等体积 PBS 重悬;根据死菌及活菌按 1:0、1:1、0:1 比例, 混合染色后流式细胞仪检测, 采集 10^4 个菌细胞, 在设计的测定方案中, 以前散射光/侧散射光 (FS/SS) 直方图横坐标和纵坐标为对数值, 调节 FS/SS 电压, 在此图中寻找细菌最集中的区域, 设门并对门设置的正确性进行验证, 保存数据。(2)各药物浓度下活菌比例检测:参照文献[7,8], 取适量菌液, 新鲜 MH 肉汤调整菌液浓度为 0.5 麦氏单位的菌液 (菌液浓度为 1.5×10^8 CFU/ml);加入莫西沙星注射液, 使药物终浓度分别为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 和 0.125μg/ml, 菌液终浓度为 7.5×10^6 CFU/ml, 37℃ 孵育 3h;4℃ 离心 4000r/min $\times$ 2min, 收集菌体, PBS 重悬菌体, 参照试剂说明书, 分别加入 SYTO-9 和 PI 染液, 使其终浓度为分别为 1.67 和 30μmol/L, 标记后混匀, 4℃ 共同避光孵育 15min, 流式细胞仪上机检测, 同时做阳性对照 (乙醇杀死菌悬液)、阴性对照 (不加药的菌悬液), 测定各药物浓度下活菌比例。

6. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本的比较采用方差分析, 组间两两比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 最低抑菌浓度:各时相点实验组和对照组莫西沙星对铜绿假单胞菌 ATCC 27853 的最低抑菌浓度均为 0.25μg/ml。

2. 抑菌环直径:结果表明, 实验组莫西沙星对铜绿假单胞菌 ATCC 27853 的抑菌环直径均大于对照组, 1、7、14 天实验组与对照组抑菌环直径比值分别 1.08 ± 0.01 、 1.12 ± 0.01 和 1.16 ± 0.01 , 各时相点差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。随模拟微重力时相延长, 与对照组相比, 实验组抑菌环直径逐渐延长 ($P < 0.05$)。

3. 门设定及死活菌检测结果:铜绿假单胞菌 ATCC 27853 死菌及活菌按 1:0、1:1、0:1 比例, 混合染色后流式细胞仪检测, 门设定和直方图结果见图 2。

4. 各药物浓度下活菌比例:实验组各药物浓度下活菌比例均小于对照组, 且同一药物浓度下, 实验组活菌比例与模拟微重力时相呈负相关趋势 ($P < 0.05$, 图 3)。

讨 论

近年来, 对微重力环境下致病菌的抗生素敏感度变化日益受到关注^[9]。铜绿假单胞菌是人体常见的

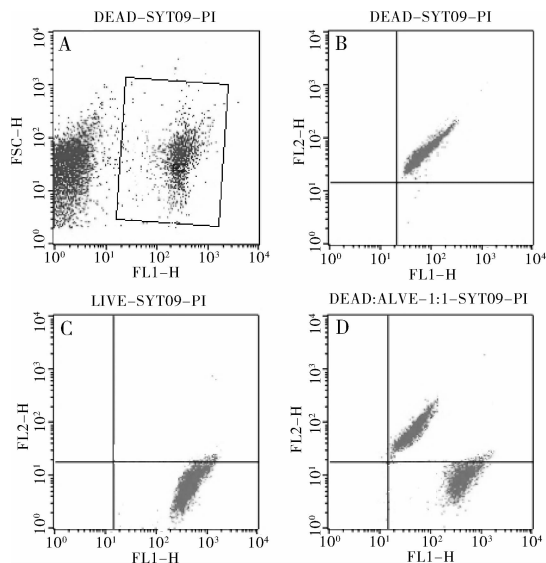


图 2 流式细胞仪药敏实验门设定及死活菌直方图

A. 设门圈定待分析细胞群; B. 一群细胞处于 SYTO-9 和 PI 荧光双阳性区域, 为乙醇处死的死菌悬液直方图; C. 一群细胞处于 SYTO-9 单阳性区域, 为活菌悬液直方图; D. 死菌和活菌按 1:1 比例混匀。上述结果表示用本法可明确区分死活细菌

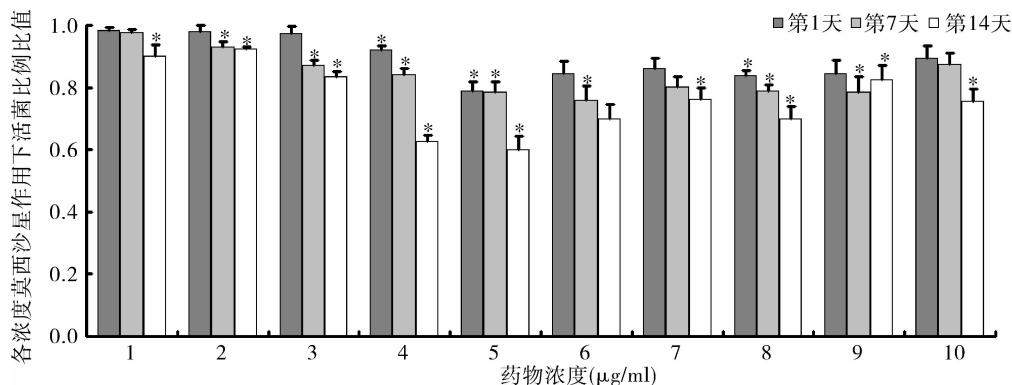


图 3 各时相点不同浓度莫西沙星作用下活菌比例比值

1~10 代表药物浓度从 0.125 μg/ml 倍数递增至 64 μg/ml, 与对照组相比, * $P < 0.05$

小于对照组, 即 14 天 RCCS 模拟微重力能增加铜绿假单胞菌对莫西沙星的敏感度。分析其机制, 可能与 RCCS 模拟微重力环境下铜绿假单胞菌杆菌在分子水平及基因水平上应激反应蛋白变化和致病因子表达等有关^[2,4,5]。尹焕才等^[12]研究发现经回转器处理的大肠杆菌出现抗生素敏感突变株, 认为 G^- 菌对微重力环境更加敏感。另有研究表明, 模拟微重力条件可促进大肠杆菌细胞壁增殖, 增强其对氯霉素和青霉素以及高渗透压和乙醇的抵抗能力^[13]。模拟微重力条件下盐古菌对枯草杆菌肽、红霉素、利福平的抗药性亦明显增加, 还有研究人员则报道了不同的研究结果^[14]。谢琼等进行的微生物宇宙飞船搭载试验显示, 微生物经搭载后的耐药性遗传指标基本稳定, 产

条件致病菌之一, 是一种致病力较低但抗药性强的革兰阴性杆菌。值得重视的是, 在“和平号”空间站和国际空间站上均分离到铜绿假单胞菌等多种细菌^[3,10]。

RCCS 是研究模拟微重力环境下微生物性状变化的一种主要方法。该系统是培养贴壁和悬浮细胞的装置, 是一种绕水平轴旋转、充满液体、通过气液两相膜进行气体交换的圆柱形旋转壁式生物反应器, 其培养室旋转带动容器内培养液和培养物一起做旋转运动, 通过调整旋转速度可实现培养液和培养物与容器壁同步旋转。培养物在水平轴上建立了近似均质液体的悬浮轨道, 重力向量持续随机分布, 使培养物维持在连续的自由落体状态, 作用于细胞的表观重力下降, 从而在地面上模拟了实验所需的类似太空的微重力环境, 同时在垂直轴上则可以创造重力环境^[11]。

本实验研究发现, 莫西沙星对经过 RCCS 模拟微重力环境处理过的铜绿假单胞菌的抑菌环直径明显延长, 且相同浓度莫西沙星作用下的活菌比例均

超广谱酶的大肠杆菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 对头孢他啶、氧氟沙星、哌拉西林等 35 种抗生素的耐药性没有变化, 蜡样芽胞杆菌对头孢唑林、头孢曲松、头孢噻肟、哌拉西林的耐药性有所减弱, 但对多数药物的耐药性不变。显然, 不同微生物在微重力环境下的生物学特性演变和药物敏感度变化有可能完全不同, 其特点及机制有待进一步研究。

本研究还发现, 14 天 RCCS 模拟微重力环境下莫西沙星对铜绿假单胞菌杆菌的抑菌环直径和相同药物浓度下活菌比例与模拟微重力时相呈负相关趋势, 即随 RCCS 模拟微重力时相延长, 铜绿假单胞菌对莫西沙星的敏感度进一步增强。另外发现, 最低抑菌浓度却没有明显变化。尹焕才等^[12]研究发现经回

转器处理的大肠杆菌抗生素敏感突变株的数量与处理时间呈正相关,微重力环境下连续培养 30 天后头孢他定敏感度增强株的突变率为 0.5%,培养 60 天后突变率增至 55%,而 120 天达到了 65%。Searles 等^[15]研究低剪切微重力环境下白色念珠菌的生长变化,发现随微重力暴露时间的延长,菌株繁殖增快,结构变异,C 白菌毒力增强,对两性霉素 B 的耐药性增大,分析认为其归因于白色念珠菌毒力相关表型对微重力环境的迅速适应。本研究结果与前者接近。最低抑菌浓度是传统的抗生素敏感度试验检测项目,通常需要菌液和抗生素共同孵育 16 ~ 24h,在此过程中,模拟微重力环境下形成的耐药性有可能发生作用,这可能是本实验研究中未能检测到最低抑菌浓度变化的主要原因^[7]。无论由于微重力环境下微生物的抗生素敏感突变株形成,还是因为微生物对微重力环境产生适应和耐受,这种截然相反的表现结果进一步说明了微重力环境下微生物变化/变异以及抗生素敏感度的多样性和复杂性。

我国即将开展空间站长期太空飞行,研究太空失重或模拟失重对微生物抗生素敏感度影响及其作用机制,不仅为阐明微生物与人类之间的相互作用以及航天任务中航天员感染治疗等一系列科学问题提供理论依据,而且还对空间微生物安全监控等都具有普遍的指导意义。

参考文献

- 1 Foster JS, Khodadad CL, Ahrendt SR, *et al.* Impact of simulated microgravity on the normal developmental time line of an animal - bacteria symbiosis[J]. *Sci Rep*, 2013,3:1340
- 2 黄玉玲,杨建武,易勇,等. 微重力及太空飞行对微生物影响的研究进展[J]. *北京生物医学工程*, 2014, 33(1):102 - 106
- 3 Taylor GR. Recovery of medically important microorganisms from Apollo astronauts[J]. *Aerosp Med*, 1974,45(8):824 - 828
- 4 Crabbé A, De Boever P, Van Houdt R, *et al.* Use of the rotating wall

- vessel technology to study the effect of shear stress on growth behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 [J]. *Environ Microbiol*, 2008,10(8):2098 - 2110
- 5 Crabbé A, Schurr MJ, Monsieurs P, *et al.* Transcriptional and proteomic responses of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 to spaceflight conditions involve Hfq regulation and reveal a role for oxygen [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011,77(4):1221 - 1230
- 6 CLSI document M100 - S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty - second informational supplement [R]. Wayne, PA: USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- 7 Hensley DM. Maintenance of antimicrobial susceptibility of acinetobacter baumannii in modeled microgravity [J]. *Clin Lab Sci*, 2010,23(2):84 - 88
- 8 马筱玲,李庆,翟志敏. 流式细胞术检测抗生素最低抑菌浓度 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004,24(1):36 - 39
- 9 方向群,张杜超,刘长庭. 微重力对病原菌毒力和抗生素敏感性影响的研究进展 [J]. *航天医学与医学工程*, 2012,25(3):220 - 224
- 10 Abbes S, Trabelsi H, Amouri I, *et al.* Methods for studying the in vitro susceptibility of *Candida* spp. to antifungals [J]. *Ann Biol Clin: Paris*, 2012,70(6):635 - 642
- 11 Rosenzweig JA, Abogunde O, Thomas K, *et al.* Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010,85(4):885 - 891
- 12 尹焕才,薛小平,杨慧,等. 模拟微重力环境下细菌生物学效应的初步研究 [J]. *航天医学与医学工程*, 2009,22(5):341 - 346
- 13 Lynch SV, Mukundakrishnan K, Benoit MR, *et al.* *Escherichia coli* biofilms formed under low - shear modeled microgravity in a ground-based system [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006,72(12):7701 - 7710
- 14 Dornmayr - Pfaffenhuemer M, Legat A, Schwimbersky K, *et al.* Responses of haloarchaea to simulated microgravity [J]. *Astrobiology*, 2011,11(3):199 - 205
- 15 Searles SC, Woolley CM, Petersen RA, *et al.* Modeled microgravity increases filamentation, biofilm, formation, phenotypic switching, and antimicrobial resistance in *Candida albicans* [J]. *Astrobiology*, 2011,11(8):825 - 836

(收稿日期:2014 - 02 - 05)

(修回日期:2014 - 02 - 24)

黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠 Foxp3 表达的影响

赵俊云 杨向竹 牛 欣 薛惠清 冯前进 周 然

摘 要 **目的** 探讨黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠外周血及脾组织中 Foxp3 表达的影响。**方法** 大鼠分组建模,1 周后给药治疗,3 周后取材,采用流式细胞术和免疫组化法分别检测各组大鼠外周血淋巴细胞亚群与脾组织中 Foxp3 的表达水平。**结**

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划基金资助项目(2011BA107B01);北京市青年英才计划项目(2014YETP0793)

作者单位:100029 北京中医药大学(赵俊云、杨向竹、牛欣);030024 太原,山西中医学院(薛惠清、冯前进、周然)