

革兰阴性菌 L型与其原菌内毒素含量比较

陈登宇, 刘 勇, 冯锡才, 夏佩莹

[摘要]目的: 探讨革兰阴性菌 L型和原菌内毒素含量差异。方法: 采用定性和定量鲎试验, 分别检测稳定的大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 L型及其原菌内毒素含量。结果: 大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 L型内毒素定性鲎试验检测阳性, 定量鲎试验检测出大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 L型内毒素含量分别为原菌内毒素含量的 25.1%和 36.4%。结论: 革兰阴性菌 L型仍能产生内毒素, 但其含量较原菌明显减少, 是其致病力减弱的原因之一。

[关键词] 革兰阴性菌; 细菌 L型; 内毒素

[中国图书资料分类法分类号] R 378 R 392.11 [文献标识码] A

Comparison of endotoxin content between Gram negative bacteria and their L forms

CHEN Deng-yu LIU Yong FENG Xi-cai XIA Pei-ying

(Department of Microbiology Bengbu Medical College Bengbu 233030 China)

[Abstract] Objective To compare endotoxin content between Gram negative bacteria and their L forms. Method The endotoxin content was detected by qualitative and quantitative limulus tests in *E. coli* and *P. aeruginosa* and their stable L forms. Results The qualitative limulus tests of Gram negative bacterial L forms were positive. The endotoxin content of *E. coli* L forms is 25.1% of their parental bacteria and *P. aeruginosa* L forms was 36.4% of parental. Conclusion Gram negative bacterial L forms generate less endotoxin.

[Key words] Gram negative bacteria; bacterial L form; endotoxins

革兰阴性菌细胞壁中内毒素——脂多糖, 是其重要致病物质。革兰阴性菌变异为细胞壁缺陷型细菌(细菌 L型)后是否仍能产生内毒素及产生量的多少, 未见专门报道。本文旨在通过定性、定量内毒素检测法, 研究革兰阴性菌 L型和原菌内毒素含量的差异, 为细菌 L型的致病性研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种 大肠埃希菌和铜绿假单胞菌标准菌株均为本室保存菌种。

1.2 主要试剂 鲎试剂盒(I、II)(上海伊华临床医学科技公司); 细菌内毒素工作标准品(中国药品生物制品检定所); 哌拉西林(齐鲁制药有限公司)。

1.3 器材处理 全部玻璃试管和移液器滴头均作严格无热原处理, 检验合格后使用。

1.4 方法

1.4.1 菌液制备 细菌 L型诱导方法: 采用平板纸片法^[1], 用哌拉西林药物纸片在 L型平板上诱导

大肠埃希菌和铜绿假单胞菌成稳定的 L型, 用无热原水制成 10^8 CFU/ml 菌液, 煮沸 100°C 、5 min 裂解细菌制成 L型待检液; 同时制备两种细菌型 10^8 CFU/ml 菌液, 煮沸裂解细菌制成待检液。

1.4.2 定性鲎试验(凝胶法) 在去热原处理过的玻璃小试管中加入鲎试剂和待检液各 0.1 ml 混合, 置于 37°C 水浴 1 h 将试管倒转凝胶不变形者为阳性。

1.4.3 定量鲎试验(显色基质法) (1) 严格按鲎试剂盒(II)说明书步骤进行实验, 于 545 nm 比色读数得测定管(s)吸光度值(A_s), 并测试剂对照管(b)和试剂空白管(bb)吸光度值 A_b 、 A_{bb} , 按计算公式: $A = A_s - (A_b - A_{bb})$ 得测定管 A 值, 再查对内毒素标准曲线求得内毒素含量, 如果 A 值超出曲线范围, 则将试样稀释再测定。(2) 标准曲线的制定。将细菌内毒素工作标准品稀释至 0.03、0.0625、0.125、0.25 和 0.5 EU/ml 然后按前述检测法测得上面各种浓度的 A 值, 定出标准曲线。

1.5 统计学方法 采用直线相关与回归分析。

2 结果

2.1 定性鲎试验 两种革兰阴性菌 L型菌液仍能使鲎试剂形成凝胶, 试验呈阳性表现, 说明 L型亦有产生内毒素能力。

2.2 定量鲎试验

2.2.1 内毒素标准曲线 测得细菌内毒素标准品

[收稿日期] 2006-03-19

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究计划项目(2001kj172)

[作者单位] 蚌埠医学院 病原生物学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 陈登宇(1978-), 男, 硕士研究生, 助教。

[通讯作者] 夏佩莹, 硕士生导师, 教授, E-mail: xia4606@sina.com

各吸光度值(A)为 0.126、0.206、0.425、0.631和 1.412 以吸光度值(A)为纵坐标,细菌内毒素浓度(C)为横坐标,作标准曲线图(见图1)。以吸光度值A对浓度C进行直线相关与回归分析,求得回归方程: $C=0.3686A-0.0129$ ($r=0.9954$ $n=5$);内毒素浓度范围:0.03~0.5 Eu/ml

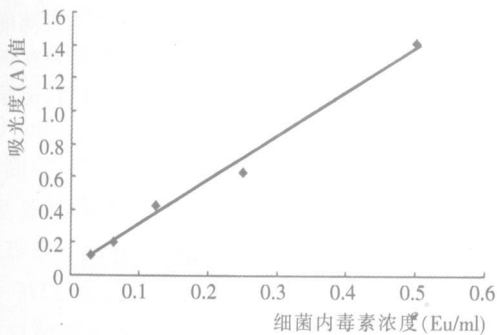


图1 细菌内毒素浓度检测标准曲线

2.2.2 检测结果 大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 L型及其细菌型 10^8 CFU/ml 菌液内毒素检测其吸光度(A)值分别为: 0.187、0.217和 0.639、0.534 求得大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 L型和细菌型 10^8 CFU/ml 菌液中内毒素的含量(Eu/ml)分别是 0.056、0.223和 0.067、0.184 L型分别为原菌内毒素含量的 25.1%和 36.4%。

3 讨论

大肠埃希菌和铜绿假单胞菌是两种常见的革兰阴性杆菌,本实验将其诱导为稳定的 L型进行内毒素检测,探讨革兰阴性菌 L型和原菌内毒素含量差异。实验结果从定性角度说明革兰阴性菌 L型仍含有内毒素;通过定量鲎试验检测出大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 L型内毒素含量分别为原菌内毒素含量的 25.1%和 36.4%,从定量角度说明相同比度的革兰阴性菌 L型菌液中内毒素含量明显少于细菌型菌液中内毒素的含量。细菌内毒素有多种生物学效应,是革兰阴性菌的重要致病物质,革兰阴性菌 L型仍含有内毒素,但其含量较原菌明显减少,可以解释 L型致病性较原菌弱的原因之一。

内毒素的化学本质,是革兰阴性菌细胞壁外膜中的脂多糖。细菌 L型是细胞壁缺陷型细菌,细菌在体内、体外多种因素作用下可失去细胞壁中的肽聚糖变异为 L型。革兰阴性菌变异为 L型后尚有外膜包绕形成原生质球,而脂多糖是外膜中的重要组成成分。研究发现破坏肽聚糖结构和影响肽聚糖合成的物质,可以使细菌变异为 L型^[2]。本实验用

青霉素类抗生素哌拉西林,诱导两种革兰阴性菌成稳定的 L型进行内毒素检测。哌拉西林是临床治疗铜绿假单胞菌和 大肠埃希菌感染的常用抗生素,对革兰阴性菌有效,作用于细胞壁,抑制转肽酶活性,影响肽聚糖的合成,发挥杀菌作用,但同时也可诱导细菌变异为 L型,造成细菌耐药。本实验研究发现革兰阴性菌 L型内毒素脂多糖含量明显少于细菌型,原因可能有:(1)当革兰阴性杆菌细胞壁肽聚糖合成受阻时,造成细菌分裂时隔壁形成障碍,以至数十个菌体连接形成长丝体,但此时 L型不稳定,易回复。当诱导细菌 L型变异为稳定的 L型时,肽聚糖层将会大部分丢失甚至完全丧失^[3],而肽聚糖层是革兰阴性菌外膜内层脂蛋白附着物,外膜附着点的减少,可能造成菌体上外膜面积减少和外膜的合成减少,以致于外膜中脂多糖含量减少。

(2)稳定的革兰阴性杆菌 L型多为长出长丝的巨型体,此时的菌体实际为细菌细胞壁肽聚糖合成严重受阻,形成细胞质不能分离的许多原生质的聚合体,裂解后形成许多原生小体。革兰阴性杆菌变异为 L型后形成有外膜包绕形成原生质球,而根据立体几何知识可知物体体积不变时由杆状体变为圆球体后将会使其表面积减少,细菌菌体的表面积减小,造成外膜面积减小,也可能造成脂多糖的减少。(3)巨型体体积庞大,是原菌体积的数十倍。本实验中用麦氏比浊法标定细菌浓度,该法是针对细菌型细菌检测细菌浓度,用于细菌 L型的检测时,就会因 L型中长丝体和巨型体体积大^[4],而造成标定出的细菌浓度不能准确代表细菌 L型的浓度,造成相同比度的 L型菌液细菌数远小于细菌型菌液细菌数,以致于检测的 L型菌液中细菌数目较低,也可能是 L型菌液检测出的内毒素浓度远较细菌型菌液内毒素浓度低的原因。综合以上分析,可能是革兰阴性菌变异为 L型内毒素减少的原因,今后可用先进的理化技术研究其确切机制。

[参 考 文 献]

- [1] 林特夫. 细菌 L型的诱导[A]. 见: 黄谷良, 林特夫, 郭秉兰编著. 细菌 L型与疾病[M]. 北京: 学苑出版社, 1991: 49-65
- [2] 周正任主编. 医学微生物学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 7-11
- [3] Hoishen G, Fritsche G, Gumpert J et al. Novel bacterial membrane surface display system using cell wall less L forms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(2): 525-531.
- [4] 孙维权, 边藏丽, 曾祥新. 四种细菌原型及其 L型形态指标分析及生物学参考值范围研究[J]. 中国卫生检验杂志, 1999; 9(6): 406-409.