

霍乱弧菌 O139 感染棘阿米巴的实验研究

姜庆五 李勤学 陈政 沈洁 钟培松 张欣 谈佳弟 邵月琴 李子华

【摘要】 目的 探讨霍乱弧菌能否在阿米巴原虫内生存。方法 采用霍乱弧菌 O139 与多噬棘阿米巴的共培养方法,通过倒置显微镜、革兰染色和电镜超薄切片观察霍乱弧菌在阿米巴滋养体和包裹内生存情况。结果 培养 24 h,革兰染色可见霍乱弧菌 O139 已进入阿米巴滋养体的吞噬泡内,随共培养时间的延长,可见吞噬泡内霍乱弧菌 O139 增多。电镜下可见霍乱弧菌 O139 在阿米巴环境中的不同感染期:包括胞饮期、吞噬泡形成期、增殖期及滋养体裂解释放,部分感染的滋养体发生包裹化,胞浆吞噬泡内可见存活 O139 弧菌。结论 霍乱弧菌 O139 能在棘阿米巴滋养体内生存繁殖,并存活于包裹胞浆的吞噬泡中,因此棘阿米巴原虫可能是霍乱弧菌 O139 的环境贮存宿主之一。

【关键词】 霍乱弧菌;棘阿米巴;细胞内共生生物

Survival and growth of *Vibrio cholerae* O139 inside *Acanthamoeba* JIANG Qing-wu*, LI Qin-xue, CHEN Zheng, SHEN Jie, ZHONG Pei-song, ZHANG Xin, TAN Jia-di, SHAO Yue-qin, LI Zi-hua. *School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China
Corresponding author: JIANG qing-wu, Email: qwjiang@shmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the survival and growth of *Vibrio cholerae* inside the *Acanthamoeba* polyphage. **Methods** Survival and growth of *Vibrio cholerae* O139, co-cultured with *Acanthamoeba* polyphaga, was observed inside the trophozoites and cysts, using Gram stain and electron microscope. **Results** Viable O139 was observed inside the amoebal vacuoles in 24 hours. Vacuoles were filled with more bacteria along with the longer period of co-culture. The process of O139 infection with *Amoebae* would include uptake, formation of O139 vacuole, multiplication, trophozoites lysed and expel under electron microscopy. Some infected trophozoites could subsequently encyst and the surviving O139 could locate in the vesicles inside the cysts. **Conclusion** O139 might survive and multiply in the trophozoites and reside inside the cysts of *Amoebae*, suggesting that *Acanthamoebae* might serve as one of the environmental hosts of *Vibrio cholerae*.

【Key words】 *Vibrio cholerae*; *Acanthamoeba*; Endosymbiont

自由生活阿米巴原虫是水生环境中一种掠食性的原生动物,对控制环境中微生物平衡作用已为人们熟知,但其作为一些重要的水源性致病菌的环境宿主才刚刚引起人们的重视,被微生物界称为“特洛伊木马”^[1]。自 1980 年证实嗜肺军团菌能在棘阿米巴内生存繁殖以来,有关新的阿米巴胞内菌如肺炎衣原体、副衣原体、李斯特菌等在阿米巴中生长繁殖并引起社区和医院内感染的报道在增多^[2-4]。虽然对于霍乱弧菌的生物学特性的了解取得了很大进展,但关于该菌在疫区季节性流行期间的生存(即越冬机制)问题仍未清楚^[5],阿米巴原虫可能是霍乱弧

菌生存繁殖的水生态环境宿主而受到重视^[6],为此我们进行了霍乱弧菌在阿米巴内生存的实验研究。

材料与方 法

1. 霍乱弧菌的培养:一株来自于自然爆发疫区分离出的霍乱弧菌 O139 菌株,经双洗琼脂(SSDSPT)培养基复苏后,用碱性蛋白胨水(AP)增菌 37℃ 过夜备用。

2. 阿米巴原虫的培养:我们采用一株多噬棘阿米巴(ATCC 30461),在 5 ml 的细胞培养瓶中(预置盖玻片),经 PYG712^[7],25℃ 培养 2-3 天达到生长对数期,浓度约为 1×10^6 个/ml。

3. 方法:将上述培养好的的滋养体上清液弃掉,加入已调制成浓度约 1×10^7 /ml 的 O139 菌液 1 ml,35℃ 感染 2 h,再加入阿米巴生理盐水,25℃ 培养,分别于 24、48、72 h 取出盖玻片,在生理盐水漂洗

作者单位:200032,复旦大学公共卫生学院(姜庆五、李勤学、沈洁、李子华);上海市嘉定区疾病预防控制中心(陈政、钟培松、张欣、谈佳弟、邵月琴)

通讯作者:姜庆五,Email:qwjiang@shmu.edu.cn

1 min, 染色观察胞内感染情况, 并收集已感染的阿米巴滋养体, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清后, 经 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液固定 2 h, 1% 的锇酸固定 2 h, 经乙醇 (50%、70%、90%)、丙酮 (90%) 梯度脱水, 用纯丙酮和包埋液浸透过夜、再固化, 切片 50~60 nm (用 LKB-1 型超薄切片机), 再经 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 然后透射电镜观察拍片 (PHILIPS CM-120)。

4. 成囊过程: 对经涂片观察已确认有感染滋养体, 我们采用成囊方法^[8], 使滋养体形成包囊, 方法如下: 弃培养液上清后, 先加成囊低盐溶液洗涤 2 次, 再加入成囊高盐溶液作用 24~48 h, 在倒置显微镜下观察成囊情况, 待 80% 以上滋养体成囊后, 离心收集包囊, 经固定后送电镜室超薄切片观察 (固定、脱水、浸透、固化、切片步骤同上)。

结 果

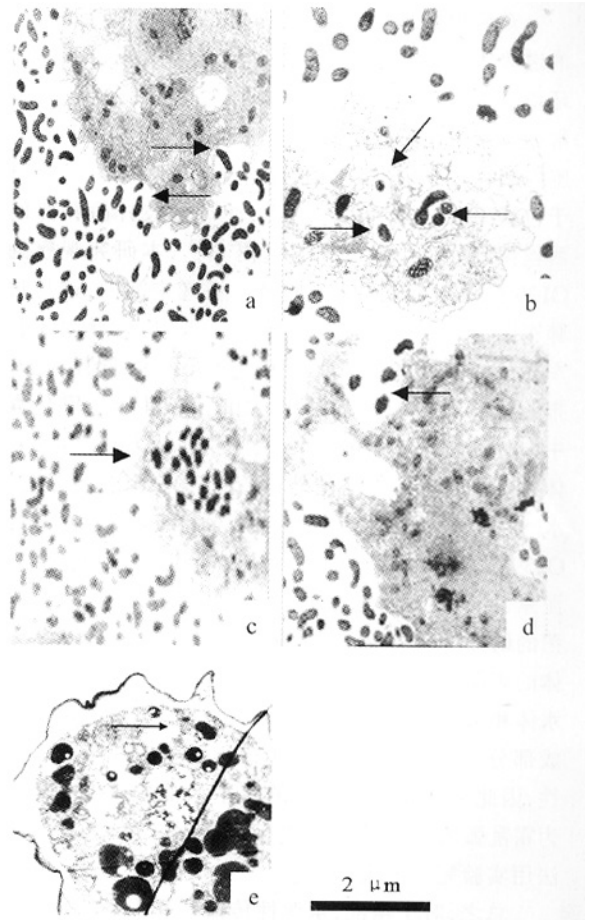
1. 培养结果: 在培养 24 h 后, 通过细胞片染色后就能观察到大量的霍乱弧菌 O139 吸附于棘阿米巴滋养体外膜上, 部分阿米巴滋养体的吞噬泡内可见霍乱弧菌, 并随培养时间的延长, 吞噬泡内菌量增多。

2. 感染过程: 在电镜下, 可见霍乱弧菌 O139 感染阿米巴滋养体的不同时期, 包括胞饮期、吞噬体形成期, 吞噬体内繁殖期 (图 1a、b), 在胞饮期, 可见滋养体细胞膜将霍乱弧菌 O139 包入体内; 细菌进入胞内后形成由细胞膜组成的含有单个细菌的吞噬体, 在吞噬体内, 似有细菌分裂增殖, 形成 O139 大吞噬体 (图 1b、c), 感染后期可见滋养体被裂解, 霍乱弧菌从吞噬体中释放至胞外 (图 1d)。

3. 生存状况: 在阿米巴包囊内, 可见单个的弧菌存在于胞浆中吞噬泡内, 成静止状态, 细菌的形态完整, 未见增殖型吞噬体 (图 1e)。

讨 论

在微生物与阿米巴原虫的相互作用中, 大部分细菌成为弱者, 为阿米巴所杀死消化, 但经过长期进化选择, 部分细菌获得了逃避宿主细胞的杀死能力, 形成与宿主共生或寄生状态。对于胞内菌与阿米巴原虫之间相互作用机制的认识主要来自于对嗜肺军团菌的研究报道, 嗜肺军团菌适应阿米巴胞内生存使其获得感染人的哺乳类细胞, 同时发现嗜肺军团菌在阿米巴原虫和巨噬细胞内具有相似的胞内生长



a: 单个 O139 弧菌为滋养体所吞噬现象 ($\times 6500$ 倍); b: O139 弧菌在滋养体中形成吞噬体, 含有单个弧菌的吞噬体, 似有二分增殖现象 ($\times 8400$ 倍); c: 阿米巴滋养体内 O139 弧菌增殖型吞噬泡, 含有许多繁殖后 O139 菌; d: 滋养体裂解, O139 从滋养体释放胞外; e: 在阿米巴包囊内 O139 弧菌生存于吞噬体内成静止状态

图 1 霍乱弧菌在阿米巴内培养生存状况

特性。因此认为抗阿米巴原虫的消化作用是环境细菌的致病性的外源性进化动力, 也是细菌的生态特性与致病性之间的联系纽带。嗜肺军团菌通过在阿米巴内抑制吞噬溶酶体空泡的融合; 降低空泡的酸化能力; 产生保护性的外膜结构等来抵抗吞噬细胞^[9,10]。研究显示 O139 弧菌能在阿米巴内形成吞噬体空泡, 并能在空泡内生存和繁殖, 最终裂解滋养体或胞吐方式释放胞外, 表现出与嗜肺军团菌相似的胞内生长特性, 表明含有 O139 的空泡也能抵抗阿米巴溶酶体融合消化, 并能利用宿主细胞进行增殖, 由于 O139 并非专一的胞内生长菌, 因此在阿米巴原虫内是否具有与嗜肺军团菌相同的生存机制值得进一步研究。

众所周知,阿米巴原虫具有二个生活期,即活动的滋养体期和静止的包囊期,当滋养体处于不利的环境下,就会形成包囊,抵御不利的环境,这同时也帮助了胞内菌抵抗不利的物理和生化环境。不同的胞内菌存在于包囊中的位置不同,嗜肺军团菌分布于包囊原浆的吞噬体空泡内,而鸟分枝杆菌和弗朗西斯菌则分布于双层细胞壁内^[11,12],本研究观察到 O139 弧菌存在于阿米巴包囊的吞噬空泡内,这与嗜肺军团菌的分布位置相类似。在水中,包囊内嗜肺军团菌能够抵抗含氯消毒剂的杀灭作用,同样,也有报道经 HCl 处理过棘阿米巴和耐格里阿米巴包囊中能分离出霍乱弧菌^[6,13],因此我们认为 O139 在水中除了直接体外增殖外,还存在第二条生活环,即水→阿米巴原虫→水的过程,阿米巴原虫可能是 O139 弧菌的水环境宿主,而从水环境的鱼类、黄鳝、泥鳅、贝壳类以及绿藻类、水生植物中分离出霍乱弧菌的研究报道^[14],只表明霍乱弧菌能够吸附于这些水体的表面,尚不是真正的宿主,而阿米巴原虫是这些水体和水生生物的常见居民,也是生物膜的重要组成部分^[3,15],阿米巴原虫具有与弧菌较一致生态特性,因此更可能是其真正的宿主。虽然还有报道认为霍乱弧菌以变异的形式存在于水环境中,但仍无法用实验完全证实^[16]。

总之,对于霍乱,水源性传播是其主要的传播途径,但其在水中的存在形式以及如何越冬仍是国内外悬而未决的问题,本实验证实了 O139 弧菌在常温下能在棘阿米巴滋养体和包囊内生存、繁殖的过程,为阿米巴原虫可能是霍乱弧菌的环境宿主的假设提供了线索,也为揭开霍乱弧菌的越冬之迷提供新的方向。

参 考 文 献

1 Barker J, Brown MRW. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 1994, 140: 1253-1259.

2 Field BSC. The molecular ecology of *legionellae*. *Trends Microbiol*, 1996, 4: 286-290.

3 Brown MRW, Bark J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilm. *Trends Microbiol*, 1999, 7: 45-50.

4 Jadwiga WK, Linder E. Bacterial infections of free-living *amoebae*. *Res Microbiol*, 2001, 152: 613-619.

5 王长鳌,肖东楼,蔡润河,等. 霍乱弧菌越冬机理的研究进展. *疾病监测*, 1997, 12: 26-29.

6 Thom S, Warhurst D, Drasar BS. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water *amoebae*. *J Med Microbiol*, 1992, 36: 303-306.

7 Rowbotham TJ. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens *via amoebae*, and the interaction of those and other isolates with *amoebae*. *J Clin Pathol*, 1983, 36: 978-986.

8 Kahane A, Dvoskin B, Mathias M, et al. Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within *amoebal* cysts. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 4789-4795.

9 Omar SH, Chandrasekar V, Bradley J Hacck, et al. Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' Disease Bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 126-132.

10 Molmeret M, Yousef AK. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? *Trends Microbiol*, 2002, 10: 258-260.

11 Steinert M, Kristin B, White E, et al. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in culture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2256-2261.

12 Hadi A, Johansson T, Golovliov I, et al. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 600-606.

13 Hadi A, Weintraub A, Gunnar S. Interaction between *Vibrio cholerae* and *Acanthamoeba castellanii*. *Microbial Ecol Heal & Dis*, 2004, 16: 51-57.

14 Cowell R, Huq A. Marine ecosystem and cholera. *Hydrobiologia*, 2001, 460: 141-145.

15 Rodney MD. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8: 881-889.

16 Colwell RR. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J Infect & Chemoth*, 2000, 6: 121-125.

(收稿日期:2004-06-24)

(本文编辑:尹廉)